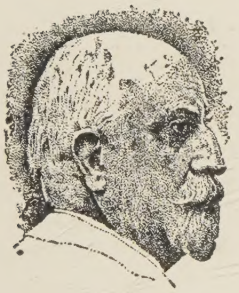
VOLUMEN 10 ENERO-MARZO 1957 NUM. 1

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



RAM
M M
COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
23 MAR 1960

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Páginas

Charles Thom (†) 1

Flora bacteriana Gram-positiva en infecciones del aparato urinario. I. Identificación, frecuencia y antibiograma, por *A. Socías* y *A. Portolés* 5

Un nuevo tipo de inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas, por *Miguel Rubio Huertos* 43

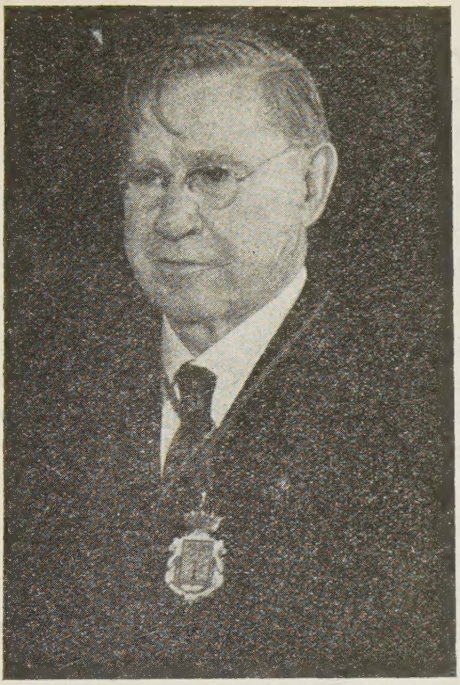
Identificación de bacteriófagos mediante técnicas serológicas. II. Bacteriófagos procedentes de personas afectas de infección del aparato uro-genital, por *M.ª Luisa Alonso* 53

¿La *Salmonella typhica* adquiere resistencia frente al cloramfenicol?, por *J. Vidal Munné* y *J. Vidal Tort* 61

Estudios sobre purificación y desantigenización enzimática de sueros y plasmas antitóxicos. III. Estudio teórico de las valoraciones de la función antitóxica y anafiláctica de los sueros y plasmas antitóxicos, por *F. Cordón* y *A. Martínez* 69

Acción de los agentes químicos sobre los virus y experiencias con el antivariólico cultivado en huevos de gallina, por *M.ª Luisa Alonso* 99

Estudio y control analítico microbiológico del papel moneda, por *E. Gastón de Iriarte* y *M.ª Lourdes Lloveras* 115



CHARLES THOM †

El eminente microbiólogo Charles Thom nació el 11 de noviembre de 1872, en una granja situada al norte de Minonk, Illinois.

Después de su graduación en Lake Forest College, pasó un año enseñando, en la escuela de Danville, pero en seguida regresó a Lake Forest en 1896, y fué el primer estudiante que se graduó en Master of Arts (1897).

Se doctoró luego en 1899 en la Universidad de Missouri, con el trabajo titulado «El proceso de fertilización en *Aspidium* y *Adiantum*», siendo ésta la primera tesis de grado de doctor (Ph. D.) concedida por esta institución.

En el año de 1902 fué a la Universidad de Cornell en calidad de asistente graduado en Micología, donde el interés que tiempo atrás le había

sido despertado por su profesor Harper, acerca de los hongos, tomó definitivamente cuerpo en nuestro bacteriólogo.

Posteriormente estudió los mohos que intervienen en el proceso de la maduración de los quesos. En esta ocupación se dedicó primeramente al estudio del *Penicillium camemberti* y *P. roqueforti*, describiendo ambas especies. En 1910 publicó sus «Estudios de cultivo de las especies de *Penicillium*».

En 1914 pasó a ocupar el puesto de micólogo encargado del Laboratorio de Micología del Servicio de Química en la misma Universidad. Sus principios sobre las industrias de alimentos fueron recopilados en su libro «Hygienic Fundamentals of Food Handling».

Por otra parte, trabajando en colaboración con miss Church, publicó una serie de artículos sobre diferentes grupos de *Aspergillus*, y estos estudios culminaron en la publicación de una interesante monografía sobre el género citado (1926).

Con la colaboración de Thom, diversos investigadores de otras ramas del Departamento de Agricultura establecieron, en el plazo de cinco años, la mayor factoría dedicada a fermentaciones mediante mohos.

Desde 1927 hasta su retiro en 1942, Thom fué el encargado de la Sección de Microbiología del Suelo, primero en el Buró de Química y Suelos, y después—año de 1934—en el Buró de la Industria de las Plantas.

El doctor Thom se retiró del servicio activo a la edad de setenta años (1942); pero anteriormente, junto con Raper, realizó otras investigaciones sobre el grupo del *Aspergillus nidulans* y *A. glaucus*, lo que le hizo darse cuenta de que su primitiva monografía de 1926 no estaba de acuerdo con sus realizaciones posteriores, por lo que publicó en 1945 «Monograph of the Aspergilli». Cuatro años más tarde, en colaboración con Fennell, veía la luz su «Manual of Penicillia».

Puede decirse de la atrayente figura de Charles Thom que era un hombre siempre amable con sus amigos y discípulos, y que mantenía el criterio de que cada cual debía labrar su propio campo, como él lo había hecho. Gozaba ayudando a los demás, y buena prueba de ello es el hecho de que determinara más de mil mohos en su vida, a beneficio de otros investigadores.

Pertenecía a numerosas sociedades científicas y llegó a ser director de la «Mycological Society of America» y presidente de la «Society of American Bacteriologists».

Visitó España en compañía de su esposa en abril de 1947, donde fué nombrado Miembro Honorario del C. S. I. C. y Socio de Honor de nuestra Sociedad de Microbiólogos Españoles (uno de los más antiguos de ella), siéndole impuesta la Medalla de Oro del Consejo por sus relevantes investigaciones en Microbiología y Medicina.

Fué principalmente biólogo; ardiente prohibicionista, conservador en política y profundamente religioso.

Falleció en su casa de Port Jefferson, New York, el 24 de mayo de 1956.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/international-microbiology_january-march-1957_10_1

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

FLORA BACTERIANA GRAM-POSITIVA EN INFECCIONES DEL APARATO URINARIO

I.—Identificación, frecuencia y antibiograma.

POR

A. Socías y A. Portolés.

En el transcurso de los años 1954 a 1956 hemos efectuado una serie de exámenes microbiológicos, entre los que, seleccionando los pertenecientes a productos patológicos procedentes del aparato urinario de enfermos repetidamente tratados con antibióticos, resultaron interesantes algunas observaciones, que nos condujeron a la iniciación de la serie de experiencias que recogemos en esta publicación.

Entre las bacterias encontradas figuran colibacilos, aerobacter, difterimorfos, estafilococos, estreptococos, etc. Es preciso destacar el papel principal, si no esencial, que representan los gérmenes del tipo enterococo (58,2 por 100 de los casos), ya sea aislado o asociado.

Creemos resulta de interés el estudio del comportamiento frente a los antibióticos de algunas de las especies microbianas anteriormente citadas—los Gram-positivos precisamente—, porque al efectuar, en la mayoría de los casos, los antibiogramas correspondientes, nos encontrábamos en ocasiones que, pese a su manifiesta sensibilidad *in vitro* a determinado agente terapéutico, no se lograban sobre el organismo enfermo los resultados esperados, ya que, si bien aparecía una mejoría pasajera, se presentaban frecuentemente recidivas que prolongaban durante un cierto tiempo el estado de enfermedad, sobre todo cuando la infección se alojaba en vías altas o cuando se trataba de asociaciones enterococo-difterimorfos.

Este fenómeno de sensibilidad limitada *in vitro* y determinada resistencia *in vivo* a los antibióticos, lo hemos observado en el 48 por 100 de las infecciones provocadas por enterococos, y en el 89,7 por 100 de los

casos en que esta especie estaba asociada a bacilos difteroides en procesos crónicos; por ello, hemos querido estudiar más detenidamente las características de estos gérmenes y su grado de sensibilidad frente a sulfamidas y antibióticos, observando la presencia de una discreta avolución hacia la resistencia de algunas especies; hecho ya demostrado por Barber, Mayhoe Whitehead (1) en estafilococos penicilinasa-positivos, lo mismo que por Dukes y Dukes (2), Parmala (3), Rantz y Rantz (4) y Finland y Haight (5).

A) EXAMENES BACTERIOLOGICOS EN PRODUCTOS PATOLOGICOS

Las muestras, integradas por orina, secreciones y exudados procedentes de distintos enfermos, se recogieron según las técnicas clásicas para obtener productos sin contaminaciones accidentales.

Los sedimientos urinarios se examinaron en fresco, mediante la técnica de Liebeschütz, y las preparaciones se tiñeron por los métodos de Gram, Ziehl o Giemsa, según los casos.

Los microorganismos se aislaron por cultivos sobre diferentes medios y a distintas temperaturas, practicando a continuación las pruebas bacteriológicas correspondientes para la identificación de estos agentes microbianos, al mismo tiempo que se ensayaban frente a los antibióticos.

Las características generales de los productos patológicos examinados se pueden resumir de la siguiente manera:

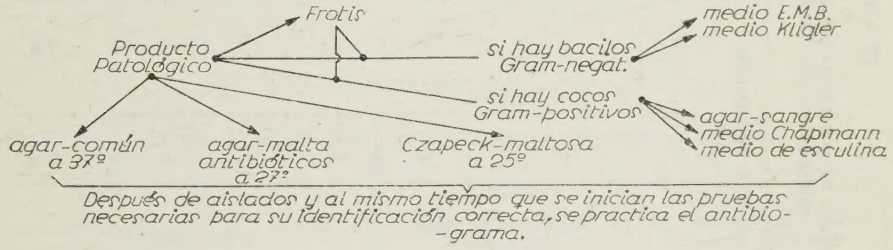
Orina: En su mayoría tenían aspecto turbio o ligeramente opalino; pH = 6,5 a 7,8; su examen químico revela presencia de mucina en cantidades variables, nucleoproteína a veces, y albúmina casi todas (de 0,15 a 0,45 grs./litro); en el sedimento se encuentran ácido úrico y fosfatos, uratos y oxalato cálcico, marcada piuria (más de 20 piocitos por campo) (*), con células escamosas pequeñas, delgadas y laminadas, y otras pavimentosas más grandes, a veces escasos cilindros granulosos o hialinos; la flora microbiana estaba integrada por cocos Gram-positivos de tamaño variable, bacilos Gram-positivos algo pleomórficos o bacilos Gram-negativos de as-

(*) Con objetivo 8 mm. Ap. y ocular × 5,6.

pecto variable, y a veces células levaduriformes Gram-positivas. En algunos casos no se encontraron gérmenes por tratarse posiblemente de procesos asépticos producidos por cálculos, retenciones vesicales o eliminación de productos más o menos cáusticos.

Secreciones y exudados: En los frotis de éstos se observó la presencia de células epiteliales pavimentosas y leucocitos o piocitos en número variable, así como también gérmenes parecidos a los descritos anteriormente. Se encontró, en los procedentes de flujo vaginal, las células de descamación con tendencia basófila y núcleos no picnóticos, y escasos bacilos de Döderlein.

El esquema de trabajo seguido por nosotros, y con el que hemos conseguido buenos y bastante rápidos resultados, puede ser representado como sigue:


Frotis
Producto Patológico
si hay bacilos Gram-negat.
medio E.M.B.
medio Kligler
si hay cocos Gram-positivos
agar-sangre
medio Chapmann
medio de esculina
agar-común a 37º
agar-malta antibióticos a 27º
Czapeck-maltosa a 25º
Después de aislados y al mismo tiempo que se inician las pruebas necesarias para su identificación correcta, se practica el antibio-grama.

Los resultados, que se resumirán más adelante en el Cuadro I, demuestran que las afecciones urinarias por nosotros examinadas han sido monomicrobianas en un 49,06 por 100, y el 38,62 por 100 polimicrobianas, aparte de un 12,32 por 100 de casos en los que no se demostró presencia de microorganismos y de 63 casos de infecciones antibiótico-resistentes en que, por tratarse de complicaciones micósicas, formaron parte de otros trabajos (6).

CUADRO I

RESUMEN DE RESULTADOS DE LOS EXÁMENES BACTERIOLÓGICOS DE PRODUCTOS PATOLÓGICOS PROCEDENTES DEL APARATO GÉNITO-URINARIO

Gérmenes idéntificados como agentes productores de infección	Exámenes de sedimentos urinarios			Exámenes de exudados			Total de especies o asociaciones bacterianas	Número total de casos examinados = 292
	Cistitis	Pielitis	Nefritis	Uretritis	Prostatitis	Vaginitis		
Estafilococos	6	—	—	2	—	1	9	
Enterococos	24	6	3	10	—	5	48	
Gonococos	—	—	—	25	—	—	25	
Estafilococos + colibacilo	4	1	—	—	—	1	6	
Enterococos + colibacilo	11	4	—	—	1	3	19	
Enterococos + difteroides	46	20	7	3	2	4	82	
Difteroides	14	3	—	2	—	—	19	
Difteroides + colibacilo	2	4	—	—	—	—	6	
Colibacilos	13	12	9	—	1	3	38	
Aerobacter	1	2	—	—	—	—	3	
Actinomyces	—	1	—	—	—	—	1	
Aparentemente abacterianas	33	—	—	2	1	—	36	
Total de casos patológicos	154	53	19	44	5	17	292	

Atendiendo al orden de frecuencia, nos encontramos con los siguientes microorganismos:

Streptococcus del Grupo D, en un 58,20 por 100 de los casos infecciosos, solo (32,21 por 100) o asociado (67,79 por 100 de estos casos) a *Corynebacterium pseudodiphtéricus* y a *E. coli.*

Staphilococcus albus, en el 5,85 por 100 de los casos, de los cuales un 66,66 por 100 aparece asociado a E. coli.

Neisseria gonorrhoae, en un 9,75 por 100, pertenecientes a 25 casos de uretritis.

Corynebacterium pseudodiphtericum, en un 41,79 por 100 de los casos, solo (17,76 por 100) o asociado (82,24 por 100 de los casos) a enterococos o colibacilos.

Escherichia coli, en el 26,95 por 100 de los casos, solo (55,08 por 100) asociado (44,92 por 100) a estafilococos, enterococos y difterimorfos.

Por último, en un 1,17 por 100 de los casos aparece *Aerobacter aerogenes,* y un 0,39 por 100 de *Actinomyces.* Un 12,32 por 100 del total de casos examinados resultaron ser aparentemente abacterianos.

Este orden de frecuencia puede establecerse estadísticamente, según el gráfico A, que refleja los resultados del cuadro II de un modo objetivo.

CUADRO II

FRECUENCIAS DE APARICIÓN EN LAS ESPECIES BACTERIANAS AISLADAS

GÉRMENES	Por ciento total encontrado	Por ciento de los casos en que aparece asociado
Estafilococos	5.85	66,66
Enterococos	58,20	67,79
Gonococos	9,76	—
Difterimorfos	41,79	82,24
Colibacilos...	26,95	44,92
Aerobacter...	1,17	—
Actinomyces	0,39	—

Gráfico B.

Gráfico A.

Si hiciéramos unas consideraciones previas referentes a estos resultados, sería lo más lógico anotar que:

a) La asociación de gérmenes es frecuente en un 44,14 por 100 de los casos infecciosos.

b) El mayor porcentaje de asociaciones lo dió el grupo difterimorfo (82,24 por 100), seguido de los enterococos (67,79 por 100) y colibacilo (44,92 por 100), siendo este último el que presenta mayor variabilidad de asociación en cuanto a especies.

c) Las bacterias que más frecuentemente se encuentran son las del grupo estreptocócico D, y son las que más fácilmente evolucionan hacia la antibiótico-resistencia, especialmente cuando van asociados a los corynebacterium.

d) Aunque no está claramente demostrado el papel patógeno de estos bacilos difterimorfos, ya que tan sólo se encontraron aislados en un 7,42 por 100 de las infecciones, representan, sin embargo, una misión importante en el desarrollo *in vivo* de la antibiótico-resistencia, preferentemente cuando se asocian al enterococo.

Prescindiremos de sacar conclusiones de orden clínico en estas investigaciones bacteriológicas, ya que es de todo punto imposible comparar con un criterio absoluto las cifras por nosotros obtenidas con las que pudieran conseguir otros autores, representando tan sólo estos datos más o menos estadísticos una visión relativa de los casos que hasta nuestro laboratorio han llegado, y que corresponden a los 292 exámenes efectuados, que se clasifican estadísticamente según el gráfico B y cuadro III.

CUADRO III

POR CIENTO DE CASOS EXAMINADOS BACTERIOLÓGICAMENTE CLASIFICADOS SEGÚN SU PATOLOGÍA

ENFERMEDADES	POR CIENTO DE CASOS EXAMINADOS
Cistitis	52,74 %
Pielitis	18,15 %
Nefritis	6,50 %
Uretritis	15,06 %
Prostatitis	1,71 %
Vaginitis	5,81 %

Ahora bien: si efectivamente es escaso el interés estadístico-clínico de estas experiencias, son, sin embargo, de gran utilidad los resultados de las pruebas frente a los antibióticos que se obtuvieron con las especies bacterianas aisladas.

Estas pruebas frente a los antibióticos pueden clasificarse en dos partes; por ello, en un principio las técnicas utilizadas para determinación de antibiogramas—con fines clínicos—fueron las de los métodos de los comprimidos del Instituto Sieroterápico de Milán (fots. 1, 2, 3) y el de los cilindros metálicos, utilizando diluciones análogas (*) a las concentraciones de los comprimidos y según procedimiento ideado por nosotros en el Instituto (fots. 4, 5). Posteriormente, al hacer el estudio detallado de estos antibiogramas para mayor número de antibióticos y sulfamidas, se emplearon discos de papel impregnado, preparados por los Laboratorios Difco (fots. 6, 7) y la Casa Pfizer (fots. 8, 9, 10).

Los resultados y su clasificación se resumirán a continuación en los cuadros correspondientes.

(*) Sol. tipo/cc.: Penicil., 15 U. O.; Estrep., 1,8 mgr.; Aureom., 0,6 mgr.; Clorom., 0,6 mgr.; Terram., 0,6 mgr.; Sulfotiaz., 1,2 mgr.; Combiótico, 15 U. O. de Penicil + 0,38 mgr. de Estrep.
Se utilizaban 0,3 c. c. de cada solución por pocillo.

CUADRO IV

HALOS DE INHIBICIÓN PARA SULFOTIAZOL Y ANTIBIÓTICOS DE MÁS FRECUENTE USO, DE LOS GÉRMENES RECIÉN AISLADOS

GÉRMENES	Sulfotiazol	ANTIBIÓTICOS						
		Penic.	Estrep.	Clorom.	Aureom.	Terram.	Combiót.	
Estafilococos	0-11	0-8	0-15	14-21	16-19	15-19	0-12	Método de los cilindros.
Enterococos	0	0	0	0-17	0-16	0-13	0	
Corynebacte	0-19	0-22	0-15	15-30	12-23	16-26	0-20	
Colibacilos...	0-15	0	0	0-16	8-14	8-16	0	
Estafilococos	0-10	0	0-14	15-21	14-18	15-17	—	Método de los comprimidos.
Enterococos	0	0	0	0-16	0-14	0-12	—	
Corynebacte	0-17	0-19	0-12	12-28	12-22	16-23	—	
Colibacilos...	0-12	0	0	8-15	0-10	0-14	—	

En este cuadro se indican los valores límites encontrados en las distintas determinaciones, y los números representan diámetros de halo en mm.

Para enjuiciar el grado de sensibilidad a los antibióticos empleados, seguimos la pauta dada en el cuadro V.

CUADRO V

CALIFICACIÓN DEL GRADO DE SENSIBILIDAD SEGÚN LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS

+++	28 mm.	AS = Altamente sensibles.
++	23 a 27 mm.	CS = Claramente sensibles.
+	16 a 22 mm.	RR = Relativamente resistentes.
0	25 mm.	R = Resistentes.

La clasificación de los gérmenes aislados con arreglo a las sensibilidades obtenidas puede, por tanto, establecerse para los diferentes antibióticos según el cuadro VI.

CUADRO VI

GRADOS DE SENSIBILIDAD DE LOS GÉRMENES AISLADOS PARA SULFOTIAZOL Y ANTIBIÓTICOS DE MÁS FRECUENTE USO

GÉRMENES	Penicil.	Estrep.	Clorom.	Aureom.	Terram.	Sulfot.
Estafilococos	0	0	+	+ a ++	+ a ++	0
Enterecocos	0 a +	0	0 a +	0 a +	0	0
Corynebacte	0	0	+ a ++	+ a ++	+ a ++	0 a +
Colibacilos...	0	0	0 a +	0	0	0

Lo hasta aquí expuesto constituye la primera parte del trabajo, es decir, el planteamiento de la cuestión; y los datos han sido obtenidos por técnicas de uso común y diagnóstico rápido ante la necesidad de un dictamen más o menos urgente; ahora bien, la observación de estos datos nos llevaron a realizar a *posteriori* una concienzuda investigación del comportamiento de algunas especies bacterianas—las Gram-positivas precisamente, por considerarlas de mayor interés—, frente a un mayor

número de antibióticos y sulfonamidas, a fin de sacar conclusiones útiles a la antibioterapia de estas infecciones por gérmenes de antibiótico-resistencia limitada. De cómo es la marcha seguida en este trabajo daremos cuenta en esta segunda parte.

B) IDENTIFICACION Y ANTIBIOGRAMA DE GERMENES GRAM-POSITIVOS AISLADOS EN INFECCIONES DE VIAS URINARIAS

1. *Los gérmenes.*

Aislados según el esquema de trabajo que se indicó anteriormente, aparecen con marcado pleomorfismo, y en los frotis reúnen las siguientes características:

a) *Estafilococos* (fots. 12, 17, 18).—Las especies aisladas pertenecientes a esta familia eran *Staphylococcus pyogenes*, var. *albus* (9 cepas) y var. *aureus* (6 cepas). Todos presentaron morfología y aspecto característico, aunque a veces se observaba un cierto pleomorfismo y frecuentemente presentaban tendencia a la gram-negatividad.

Sobre agar-sangre se manifestaron como alfa-hemolíticos y sobre agar-leche produjeron sus pigmentos característicos. Hicieron virar a tinte amarillo de medio de Chapmann y licuaron la gelatina según la técnica de Smith.

b) *Enterococos* (fots. 11, 13, 16, 19, 20, 21).—En total se han aislado 149 cepas, solas o asociadas, que se clasificaron en un 87,9 por 100 como *Enterococcus faecalis*, y el resto como *Ent. zymogenes*.

Su morfología y características culturales son las que corresponden a estos estreptococos del grupo D. Todos ellos ennegrecieron en mayor o menor grado el medio con esculina.

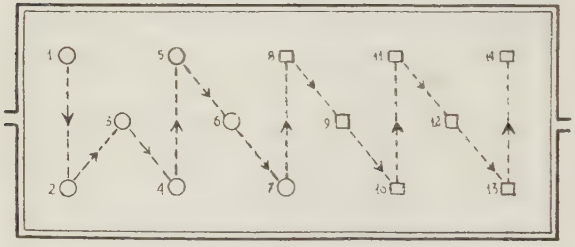
c) *Difterimorfos* (fots. 14, 15).—Se aislaron 107 cepas de bacilos fuertemente Gram-positivos, en los que a veces no se apreciaban bien las granulaciones metacromáticas, pero que clasificados todos ellos, se caracterizaron como *Corynebacterium pseudodiphtericum* en un 97,2 por 100 y *C. enzymicum* el resto.

2. *Comportamiento frente a los antibióticos y sulfonamidas «in vitro».*

a) *Técnicas.*—En primer lugar, se intentó conseguir una uniformidad o fijación de los caracteres de cada cepa por sucesivas y repetidas resiembras, a fin de evitar las variaciones debidas a su condición de recién aislados del organismo, ya que hemos tenido ocasión de comprobar que en algunos casos se apreciaban variaciones en la sensibilidad para algunas sustancias antibióticas al cabo de algún tiempo de cultivados, así como también evitar su aspecto pleomórfico, que es el síntoma externo más característico de su variabilidad.

Con estas cepas se determinaron los antibiogramas correspondientes, empleando para ello los discos de papel impregnado preparados por los Laboratorios Difco y los de la casa Pfizer para tetraciclina. Los medios y material utilizados son análogos a los empleados en otras ocasiones para esta clase de trabajos.

El planteamiento de las experiencias para cada cepa se realizó según el esquema adjunto.



1, Aureomicina. 2, Bacitracina. 3, Cloromicetina. 4, Estreptomicina. 5, Penicilina. 6, Polimixina B. 7, Terramicina. 8, Triplesulfa. 9, Thiosulfil. 10, Sulfotiazol. 11, Sulfamerazina. 12, Sulfadiacina. 13, Gantrisona. 14, Elkosina.

a, b, c, Tetraciclina.

A fin de tener un concepto cuantitativo del comportamiento de estos gérmenes frente a las sustancias ensayadas, hemos determinado los antibiogramas correspondientes al St. Londres, comprobándose que los medios y condiciones de trabajo seguidas permiten utilizar las gráficas esta-

blecidas por Y. Chabbert para obtener la sensibilidad en función de las diferencias de diámetros.

Este concepto cuantitativo no se ha seguido para las sulfonamidas, ya que estamos de acuerdo con los autores que admiten un cierto poder antisulfamida de estos medios, lo que produce alguna variabilidad en los resultados que impide una comparación correcta.

Una vez calculadas las concentraciones de antibiótico a que son sensibles las diferentes cepas, se establecen las clasificaciones mediante una serie de datos, que para mayor comodidad en las deducciones que seguirán más adelante expondremos a continuación.

CUADRO VII

CONCENTRACIONES STANDARD DE ANTIBIÓTICOS ADMITIDAS COMO MÁS FRECUENTES

ANTIBIÓTICOS	Concentraciones diarias en sangre, más comúnmente usadas	Concentraciones establecidas para clasificar el grado de sensibilidad de los gérmenes			
		Muy sensibles	Sensibles	Límites	Resistent.
Penicilina.	0,2 a 1 U. O.	0,1 U.	0,1 a 1 U.	1 a 10 U.	10 U.
Estreptomicina	3 a 10	3	3 a 10	10 a 100	100
Cloromicetina. . ..	6 a 15	6	6 a 15	15 a 100	100
Aureomicina	1,5 a 8	1,5	1,5 a 8	8 a 100	100
Terramicina . .	1,5 a 8	1,5	1,5 a 8	8 a 100	100
Tetrac.	1,5 a 8	1,5	1,5 a 8	8 a 100	100

Para los otros antibióticos por nosotros ansayados, así como para las sulfamidas, son varios los datos citados por distintos autores, y como algunos están en desacuerdo, es por lo que no los incluímos en el cuadro precedente.

Antes de dar cuenta de los resultados, y en lugar de exponer los números obtenidos en los diferentes antibiogramas, presentaremos una serie de láminas que sirven de ejemplo de las determinaciones efectuadas, ya que las hemos seleccionado entre los diferentes tipos; así, en la Lámina V se pueden ver cepas de enterococos altamente resistentes a todos los antibióticos y sulfonamidas ensayados, mientras que en la Lámina VI se trata de cepas de esta misma especie, sensibles a algunos antibióticos y totalmente resistentes a las sulfonamidas, y en la Lámina VII tenemos el ejemplo de otras cepas de sensibilidad limitada a algunos antibióticos, claramente sensibles a la cloromicetina y con marcadas zonas de bacteriostasia frente a todas las sulfonamidas. Imágenes análogas se obtuvieron con cepas de estafilococos (Láminas VIII, IX, X y XI); e igualmente, con los bacilos bacterimorfos se pueden ver cepas prácticamente resistentes frente a todas las drogas probadas, a pesar de obtenerse halos con discreta bacteriostasia (Láminas XII, XIII), asimismo se encontraron otras sensibles a distintos antibióticos y sulfonamidas (Lámina XIV) y otras con antibiogramas de diferente espectro (Lámina XV).

Algunas placas de las preparadas para ensayar la sensibilidad de los gérmenes a la tetraciclina, en sus tres concentraciones, se reúnen en la Lámina II, cuyas fotos se citaron anteriormente.

b) *Resultados.*

Las cifras que se indicarán a continuación significan los resultados finales obtenidos después de hacer cálculos y comparaciones con los datos standard, para lograr una perfecta clasificación de las distintas cepas.

1. *Estafilococos:* 15 cepas, solas o asociadas.

CUADRO VIII

ANTIBIÓTICOS	Clasificación según el grado de sensibilidad			
	Cepas muy sensibles	Cepas sensibles	Cepas límites	Cepas resistentes
Penicilina...	0	1	6	8
Estreptomicina	0	1	8	6
Cloromicetina...	1	5	6	3
Aureomicina	0	3	8	4
Terramicina	0	4	6	5
Tetracimina	0	3	7	5
Polimix. B...	0	2	6	7
Bacitracina	0	2	7	6

Como puede verse, estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores (1, 9, 10), ya que también se manifiestan como más sensibles a la clormicetina, algo menos al grupo de las tetraciclinas, y prácticamente resistentes a la penicilina, ocupando los demás antibióticos valores intermedios.

Evidentemente, los gérmenes sensibles a la aureomicina lo son también a la terramicina y tetraciclina.

El comportamiento de estas cepas a las sulfonamidas puede indicarse de la manera siguiente:

CUADRO IX

SULFONAMIDAS	Resultados positivos a las diferentes dosis		
	10 mcgr.	50 mcgr.	250 mcgr.
Triple sulfa	Ninguno.	15 B	13 + 2 B
Thiosulfil	1 B	15 B	15
Sulfotiazol...	2 B	15 B	15
Sulfamerazina	Ninguno.	15 B	15
Sulfadiazina	Ninguno.	15 B	15
Gantrisina...	Ninguno.	15 B	14 + 1 B
Elkosina	Ninguno.	15 B	14 + 1 B

Todas las cepas se han mostrado como moderadamente sensibles o ligeramente resistentes a estas drogas *in vitro*, ya que sólo cuando se actuaba a la concentración máxima se lograban pequeños halos de inhibición. La letra B indica que en estos halos no había sino ligera bacteriostasia, pero no inhibición; por tanto, según ellos, la eficacia absoluta de drogas es discutible.

2. *Enterococos:* 149 cepas en total.

CUADRO X

ANTIBIÓTICOS	Clasificación según el grado de sensibilidad en %			
	Cepas muy sensibles	Cepas sensibles	Cepas límites	Cepas resistentes
Penicilina	0	2 %	16 %	82 %
Estreptomicina	0	26 %	43 %	31 %
Cloromicetina...	8 %	64 %	11 %	17 %
Aureomicina	1 %	50 %	25 %	24 %
Terramicina	2 %	52 %	23 %	23 %
Tetracimina	1 %	51 %	25 %	23 %
Polimix. B...	0	53 %	30 %	27 %
Bacitracina	0	40 %	31 %	29 %

Los enterococos aislados son, en general, bastante resistentes a los antibióticos, hecho que pudiera definirlos como de origen intestinal, ya que la frecuente y fácil antibiótico-resistencia es una característica de los cocos intestinales; también para este grupo de gérmenes el antibiótico más activo es la cloromicetina, seguido del grupo de las tetraciclinas, y siendo casi todos insensibles a la penicilina.

Ya es sabido que la tasa de cepas resistentes no es constante; por ello, nosotros, para estas cepas bacterianas—en nuestro medio de observación y tan sólo con carácter de orientación—, hemos fijado las variaciones que en la aparición de resistencias hubo en diferentes intervalos de tiempo para tres grupos de cepas, expresando los resultados en el gráfico C.

Puede fácilmente comprobarse que hay una muy discreta tendencia hacia la antibiótico-resistencia, que se manifiesta por disminución de

41 CEPAS
43 CEPAS
50 CEPAS
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Penicilina
Estreptomicina
Cloromicetina
Aureomicina
Terramicina
Tetraciclina
Polimixina B
Bacitracina
80 16 4
30 43 27
16 23 61
24 20 56
24 21 55
23 21 56
26 35 39
28 36 36
Sept. 1953-Julio 1954
81 17 2
30 44 26
17 20 63
24 22 54
25 22 53
24 21 55
27 34 39
28 35 37
Sept. 1954-Julio 1955
84 14 2
32 43 25
19 18 63
25 22 63
26 21 53
25 23 52
29 33 38
30 35 35
Sept. 1955-Julio 1956
Cepas resistentes
de sensibilidad limitada
Sensibles

Gráfico C.

cepas sensibles a expensas del aumento de las resistentes, o cuando menos de las cepas con sensibilidad limitada.

El comportamiento de los enterococos a las sulfonamidas es:

CUADRO XI

SULFONAMIDAS	Resultados positivos a las diferentes dosis en %		
	10 mcgr.	50 mcgr.	250 mcgr.
Triple sulfa	0	0	0
Thiosulfil	0	0	25 B
Sulfotiazol	0	5 B	27 B
Sulfamerazina	0	0	24 B
Sulfadiazina	0	10 B	10 + 40 B
Gantrisina	0	0	22 B
Elkosina	0	2 B	21 B

Las sulfonamidas ensayadas sobre estas cepas tienen acción nula o escasa, aunque en un principio parecía la más activa la gantrisina; pero, al ser por ello más frecuentemente empleada, íbamos obteniendo al final resultados análogos al resto de las otras drogas.

Como en las anteriores experiencias, la letra B significa discreta bacteriostasia.

CUADRO XII

ANTIBIÓTICOS	Clasificación según el grado de sensibilidad en %			
	Cepas muy sensibles	Cepas sensibles	Cepas límites	Cepas resistentes
Penicilina	0	2 %	78 %	20 %
Estreptomicina	0	4 %	80 %	16 %
Cloromicetina...	3 %	20 %	62 %	15 %
Aureomicina	2 %	16 %	65 %	17 %
Terramicina		14 %	66 %	18 %
Tetramicina	1 %	13 %	68 %	18 %
Polimix. B...	0	1 %	73 %	26 %
Bacitracina	8	31 %	48 %	13 %

3. *Difterimorfos:* 107 cepas solas o asociadas.

Los gérmenes de este tipo se muestran francamente sensibles a la bacitracina, poco sensibles a la penicilina y menos aún a la polimixina B, quedando el resto de los antibióticos como sustancias frente a las que manifiestan un comportamiento intermedio, entre las cuales resultó más ventajosa la cloromicetina.

Para las sulfonamidas se obtuvieron los siguientes resultados:

CUADRO XIII

SULFONAMIDAS	Resultados positivos a las diferentes dosis en %		
	10 mcgr.	50 mcgr.	250 mcgr.
Triple sulfa	2 B	20 + 12 B	60 + 10 B
Thiosulfil	10 B	32 + 8 B	82 + 4 B
Sulfotiazol	11 B	32 + 7 B	81 + 6 B
Sulfamerazina	0	12 + 3 B	45 + 11 B
Sulfadiazina	0	16 + 6 B	49 + 8 B
Gantrisina	0	15 + 4 B	46 + 4 B
Elkosina	1 B	18 + 8 B	53 + 4 B

El comportamiento de estos gérmenes frente a estas drogas se puede calificar, en su mayoría, como de sensibilidad limitada, siendo las sulfamidas más eficaces thiosulfil y sulfotiazol, con las que se obtienen un 32 por 100 de cepas sensibles y un 81-82 por 100 de sensibilidad limitada, siguiendo en orden de interés: triple sulfa y elkosina, con las que se obtienen 18 a 20 por 100 de cepas sensibles, y 53 a 60 por 100 de cepas con sensibilidad limitada; el resto de las sulfonamidas produjeron resultados de escaso interés.

En estos gérmenes es frecuente la aparición de halos de bacteriostasia, aun con las dosis mínimas.

C) CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Según ya indicamos en las consideraciones previas realizadas anteriormente, se ha comprobado que las infecciones bacterianas examinadas por nosotros, localizadas en aparato urinario, son casi un 45 por 100 producidas por asociaciones microbianas, de las cuales la mayoría (82.24

por 100) están integradas por bacilos difterimorfos, que parecen intervenir en la aparición de la antibiótico-resistencia.

Los gérmenes que con más frecuencia aparecieron son los del grupo estreptocócico D, que en su gran mayoría presentaban resistencia más o menos acentuada a los antibióticos y sulfonamidas más usuales; ello induce a pensar en el origen intestinal de los mismos.

Hemos prescindido deliberadamente de sacar conclusiones de tipo clínico, limitándonos tan sólo a estudiar el comportamiento frente a distintos antibióticos y sulfonamidas de las cepas por nosotros aisladas y clasificadas, creyendo es oportuno señalar la importancia de esta investigación, sobre todo en gérmenes con antibiótico-resistencia limitada, ya que la inmensa mayoría de las infecciones por ellos producidas conducen a casos graves o complicados, en donde se emplean combinaciones de antibióticos del más amplio espectro antibacteriano, sin tener en cuenta la posible aparición de resistencias cruzadas que ocasionan el fracaso de la antibioterapia; de aquí la necesidad de determinar su antibiograma, y en algunos casos también su comportamiento frente a las asociaciones de antibióticos; aunque sea preciso tener en cuenta, sería ilusorio pensar que los resultados *in vivo* vayan a ser totalmente iguales a los obtenidos en el laboratorio *in vitro*. Ya hemos visto nosotros mismos que esto no sucede así, sobre todo cuando hay asociaciones polimicrobianas; ello obliga a mantener estrechas relaciones con el clínico, que es, en último extremo, el que ha de enjuiciar el valor de los resultados.

Con este trabajo, también se pone de manifiesto una vez más el problema de la presencia de estafilococos polirresistentes, ya observados en algunos centros hospitalarios, así como también el aumento de frecuencia en la aparición de gérmenes estreptocócicos del grupo D en estas infecciones, quizá por tratarse de especies bacterianas, que fácilmente desarrollan antibiótico-resistencia. La aparición de bacilos difterimorfos parece traer como consecuencia una inducción hacia la resistencia frente a antibióticos y sulfonamidas.

En cuanto al comportamiento de los gérmenes, se ha podido observar que tan sólo una cepa de Staph. albus, el 2 por 100 de los enterococos y el 2 por 100 de los difterimorfos, son sensibles a concentraciones de 0,1 a 1 U. O. de penicilina, mientras que el 33 por 100 de los estafilococos y un 64 por 100 de los enterococos son sensibles a dosis de 6 a 15 gammas de cloromicetina, así como un 31 por 100 de los difterimorfos es también

sensible a la bacitracina en dosis análogas a las anteriores, que son las más frecuentemente admitidas como concentraciones usuales diarias en sangre.

Estas dosis limitan la sensibilidad entre el antibiótico menos activo, la penicilina, y el más activo, cloromicetina o bacitracina, según la especie bacteriana, presentándose todas las demás cepas como sensibles a dosis superiores de antibióticos, lo que las califica como cepas de sensibilidad limitada o resistentes. Las variaciones de sensibilidad para cepas de una misma especie están condicionadas a la categoría de la infección y a la pauta seguida en la antibioterapia, ya que se presentará más fácilmente la antibiótico-resistencia cuando se trate de infecciones polimicrobianas o procedan de enfermos tratados por antibióticos a dosis ineficaces o indebidamente.

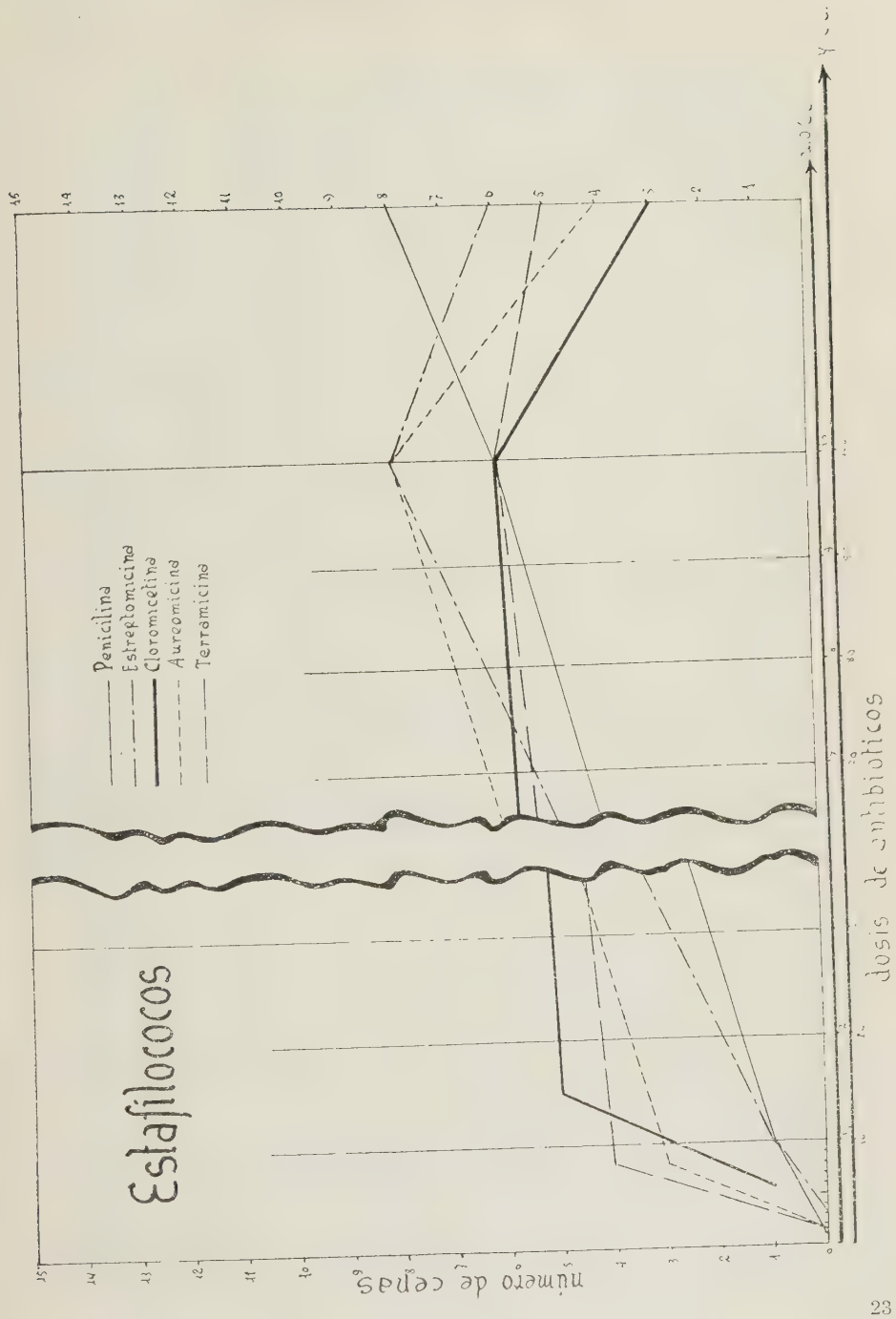
Se fijó el grado de sensibilidad, según se hace frecuentemente, es decir, por comparación entre las dosis eficaces contra el germen de prueba y contra la cepa St. Londres, y llevando las diferencias a las tablas dadas por Chabbert; con ello logramos conocer las características de cada grupo de cepas para los cinco antibióticos de más frecuente uso. Resultados con arreglo a esta clasificación son expuestos en sus gráficos correspondientes de un modo estadístico.

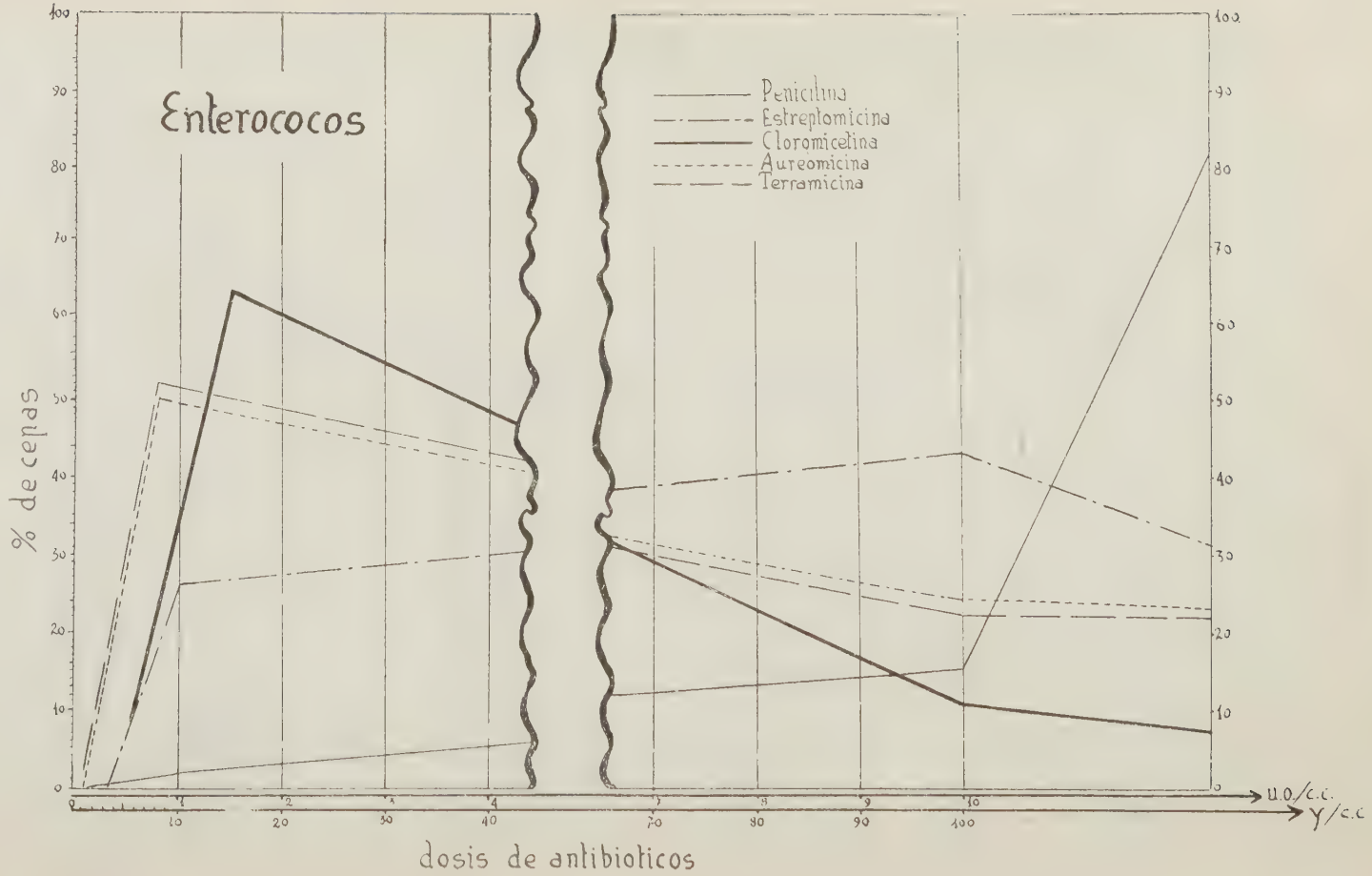
El comportamiento de los gérmenes frente a las sulfonamidas puede calificarse de resistencia en todos los casos de estafilococos y de fuertemente resistentes para los enterococos, que en un principio presentaron sensibilidad limitada a la gantrisina, pero que pronto evolucionó a resistencia. Los difterimorfos son ligeramente más sensibles, pudiendo clasificarse en su mayoría de cepas de sensibilidad limitada, frente al thiosulfil y sulfotiazol principalmente.

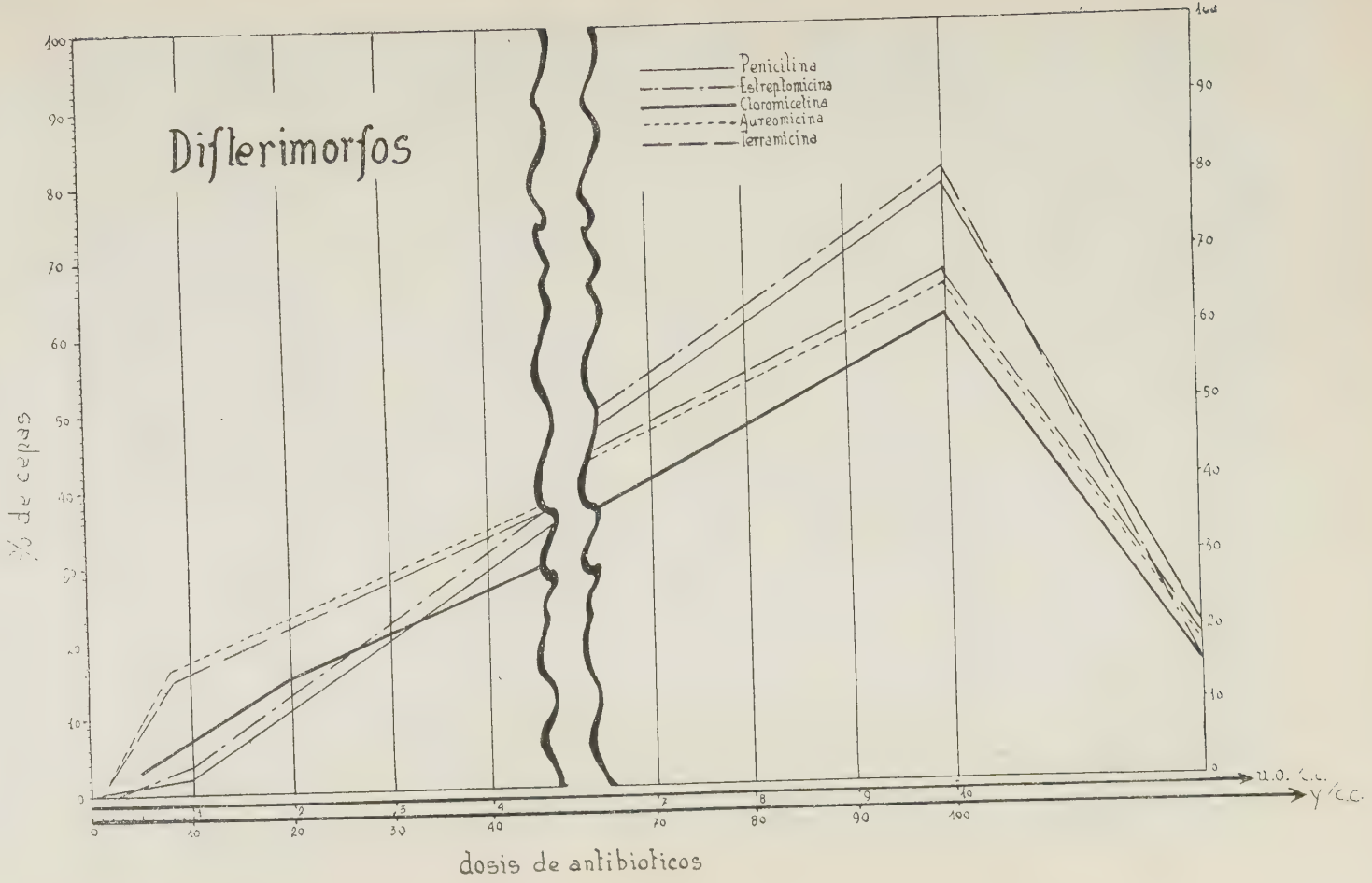
En cuanto a la actividad terapéutica o bactericida de las diferentes sustancias ensayadas, tenemos que:

La *penicilina* es prácticamente ineficaz a dosis de 0,2 a 1 U. O./c. c., que son las concentraciones más comúnmente alcanzadas en sangre. Es activa a dosis de 1 a 10 U. O. para aproximadamente una tercera parte de los estafilococos, 16 por 100 de enterococos y 78 por 100 de difterimorfos, siendo el resto de las cepas resistentes a concentraciones superiores a 10 U. O./c. c.

La *estreptomicina* sigue un comportamiento análogo a la penicilina para los estafilococos y difterimorfos, observando que dosis de 3 a 10


Estafilococos
Penicilina
Estreptomicina
Cloromicetina
Aureomicina
Terramicina
número de cepas
dosis de antibióticos


Enterococos
Penicilina
Estreptomicina
Cloromicetina
Aureomicina
Terramicina
% de cepas
u.o./c.c.
γ/c.c
dosis de antibioticos


Diflerimorfos
Penicilina
Estreptomicina
Cloromicetina
Aureomicina
Terramicina
% de cepas
dosis de antibioticos
U.O. c.c.
γ/c.c.

gammas son activas frente al 26 por 100 de los enterococos, y otro 43 por 100 de ellos son sensibles a concentraciones de 10 a 100 gammas.

La *cloromicetina* es el antibiótico que demostró más eficacia para los estafilococos y enterococos ensayados, encontrándonos que un 8 por 100 de estos últimos y el 3 por 100 de los difterimorfos ya son sensibles a concentraciones más bajas de 6 gammas.

El *grupo de las tetraciclinas* mostró un comportamiento intermedio, siendo la terramicina ligerísimamente más activa que la aureomicina y tetraciclina.

La polimixina B resultó el antibiótico menos eficaz para los difterimorfos y de una actividad intermedia entre el grupo de las tetraciclinas y la penicilina, para los estafilococos y enterococos.

La *bacitracina* dió resultados intermedios, pero dignos de tener en cuenta, para enterococos y estafilococos, y se mostró como el antibiótico más eficaz para los difterimorfos.

El grupo de *sulfonamidas* ensayadas fué eficaz tan sólo en algunos casos de gérmenes difterimorfos, pero en la mayoría de ellos, y en la casi totalidad de las cepas de las otras dos especies, resultaron prácticamente ineficaces, ya que los halos, que con ellas se obtenían, eran zonas de ligera bacteriostasia, en las que el desarrollo del germen no estaba totalmente inhibido.

Nuestros resultados con comparables a los obtenidos por Lutz y colaboradores (7) y Perret (8), para enterococos; por Estrade (9), para estafilococos, y por Moustardier y colaboradores (10), para ambos, frente a algunos antibióticos, no encontrando en la bibliografía consultada antecedentes sobre las sensibilidades de bacilos difterimorfos a ningún antibiótico ni sulfonamida.

D) RESUMEN

Se recogen los resultados de 292 exámenes bacteriológicos efectuados sobre productos patológicos procedentes de aparato urinario en enfermos tratados insistentemente con antibióticos sin resultados prácticos, verificando en cada uno de ellos aislamiento, identificación y antibiograma.

Después de fijar los caracteres de las cepas, por repetidas resiembras, se investigó el comportamiento de los estafilococos, enterococos y difterimorfos aislados, frente a penicilina, estreptomicina, cloromicetina, aureo-

micina, terramicina, tetraciclina, polimixina B, bacitracina, triple sulfa, thiosulfil, sulfotiazol, sulfomerazina, sulfadiazina, gantrisina y elkosina.

Se clasifican cuidadosamente las cepas por su grado de sensibilidad frente a los antibióticos, haciendo consideraciones gráficas y estadísticas que se concluyen en los siguientes datos: *a)* la cloromicetina se distingue como el antibiótico más activo frente a los estafilococos y enterococos polirresistentes aislados, presentando para los últimos gérmenes citados un máximo de actividad a la concentración de 15 gammas/c. c., hecho que se repite de un modo parecido con los estafilococos; *b)* frente a la bacitracina se obtienen en mayor porcentaje de sensibilidad para las cepas difterimorfas, aunque sea mayor el tanto por ciento de cepas con sensibilidad limitada para la estreptomicina; y *c)* una vez más se confirma la escasa eficacia de la penicilina frente a ciertos microorganismos Gram-positivos aislados de productos patológicos de enfermos que padecen infecciones resistentes a la antibioterapia.

E) SUMMARY

The authors make 292 bacteriological exames in pathological products proceeding from the urinary apparatus, in sicks who have not cured when they are treated with antibiotics.

At the beginning, the authors realize isolation, identification and antibiogram, in order to investigate the acion of Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin, Tetracyclin, Polimixin B, and Bacitracin; likewise the sulfonamides: Elkosin, Sulfadiazine, Sulfathiazole, Gantrisin, Sulfamerazine, Thiosulfil and Triple sulfa, in front of staphilococcus, enterococcus and corynebacterium; clasifying the strains according to their sensibility, fixing graphic and stadistic considerations, and they found conclusions about the little activity of Penicillin and the great activity of Chloromycetin for staphylococcus and enterococcus, and of the same, the strong action of Bacitracin for the corynebacterium.

F) BIBLIOGRAFIA

(1) Barber, Mayhoe y Whitehead. Lancet, 1120 (1949).
(2) Dukes y Dukes. Antibiot. Ann. 70 (1953-54).
(3) Parmala. Arb. sero-bakt. Inst. Univ. Helsinki, 22, 437 (1953).
(4) Rantz y Rantz. Stanford. Med. Bull. U. S. A. 2, 183 (1953).
(5) Finland y Haight. Arch. Int. Med. 91, 143 (1953).
(6) Socías y Pontolés. Micr. Esp. 8, 433 (1955).
(7) Lutz, Witz, Troussel, Grada y Nullans. Strasbourg. Med. 2, 1 (1951).
(8) Perret. Presse Med. 63, 1081 (1955).
(9) Estrade. Thèse médicine Bordeaux. núm. 94 (1954).
(10) Moustardier, Bentegeat y Le Noc. Rev. Immunol. 20, 105 (1956).

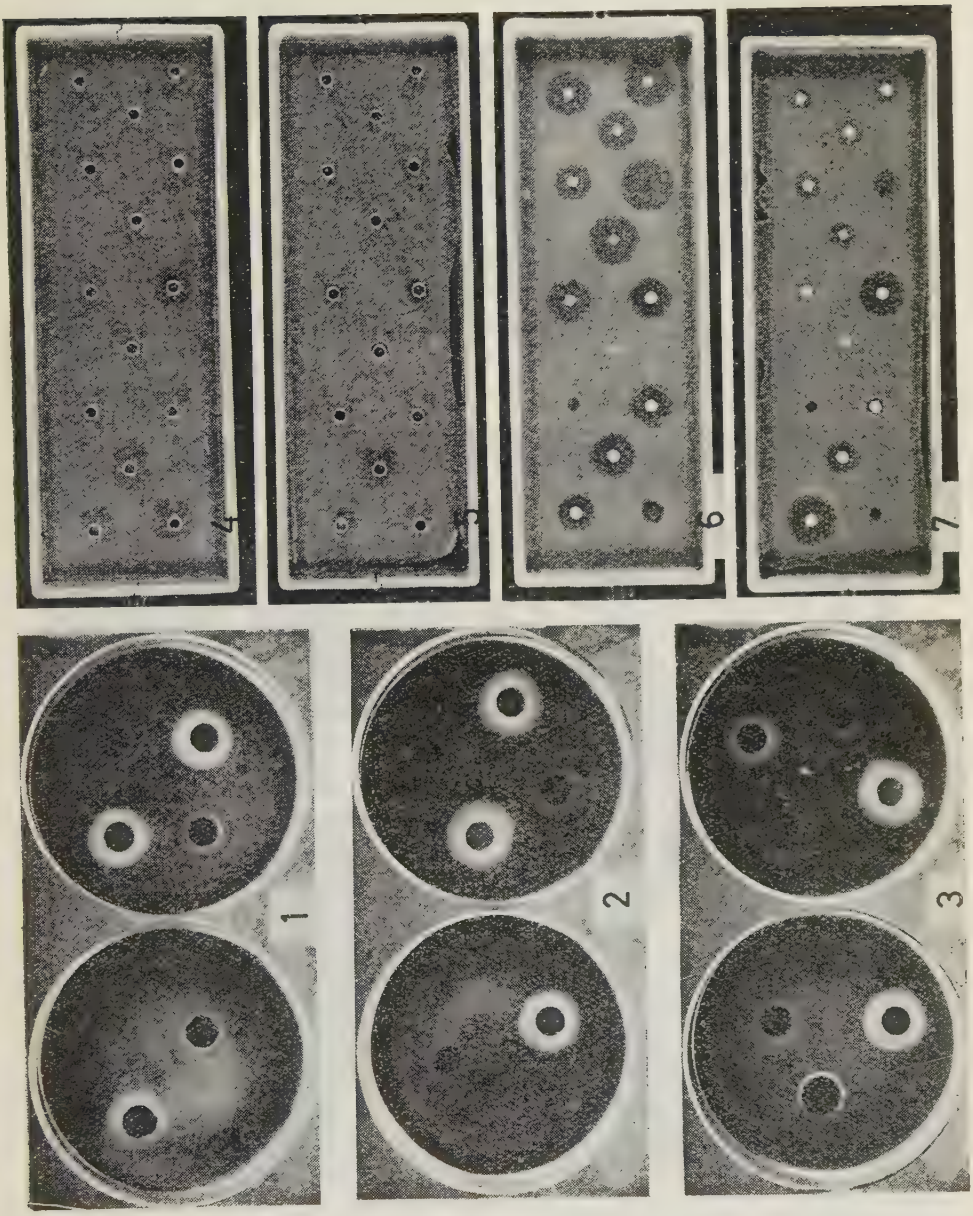
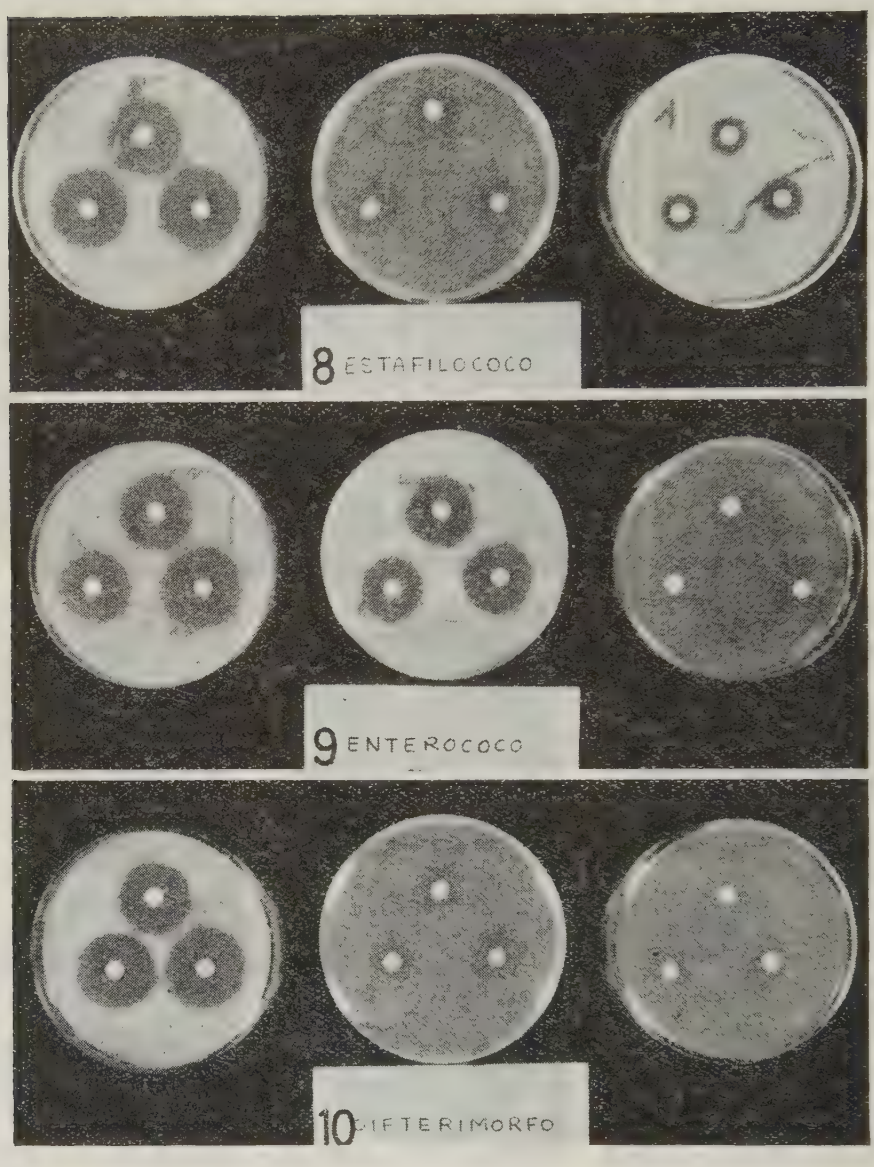
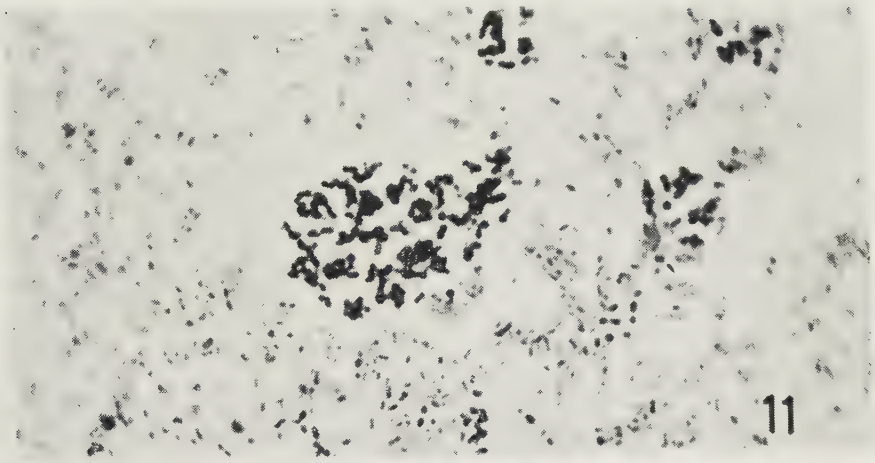
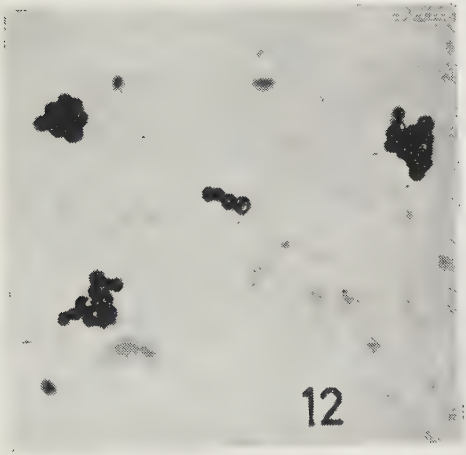


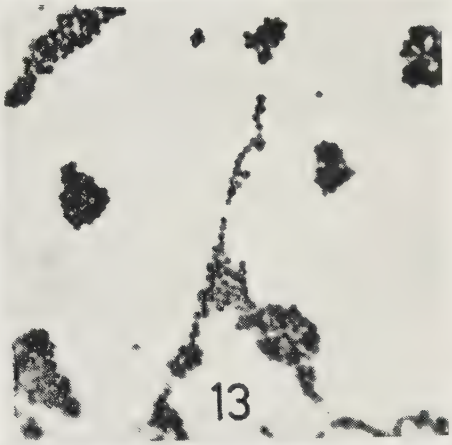
LÁMINA I.

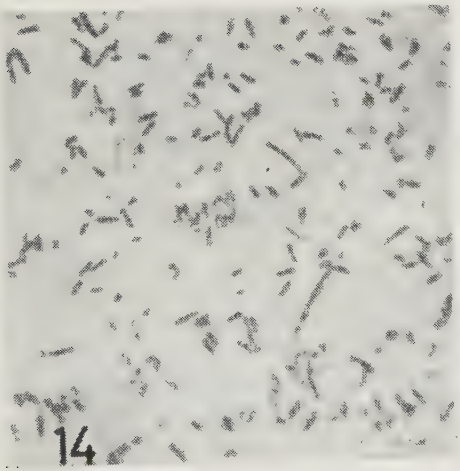
LÁMINA II.

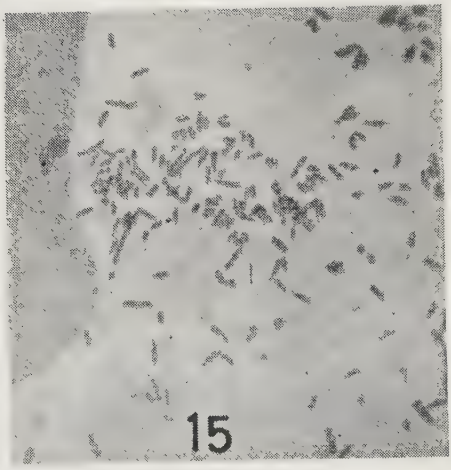


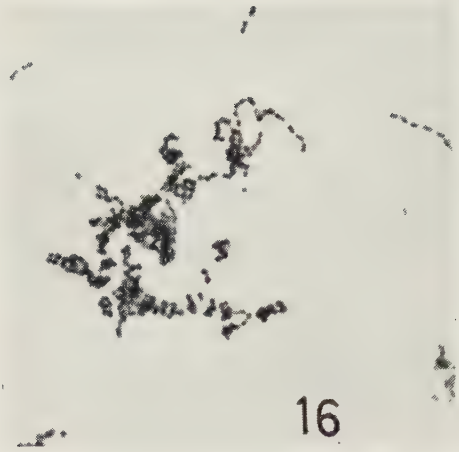

11


12

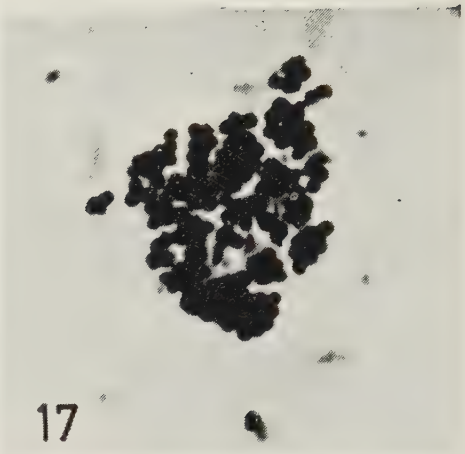

13


14


15

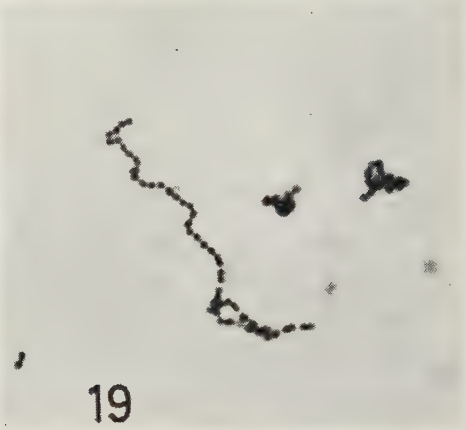


16



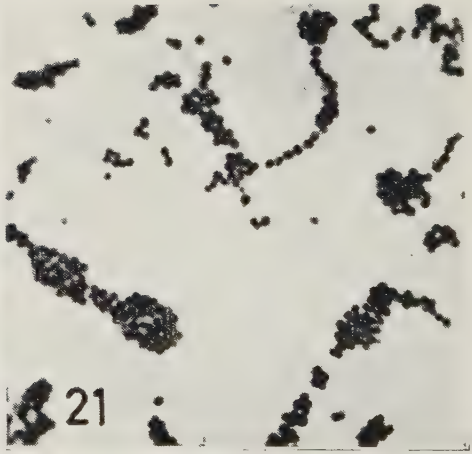
17

18

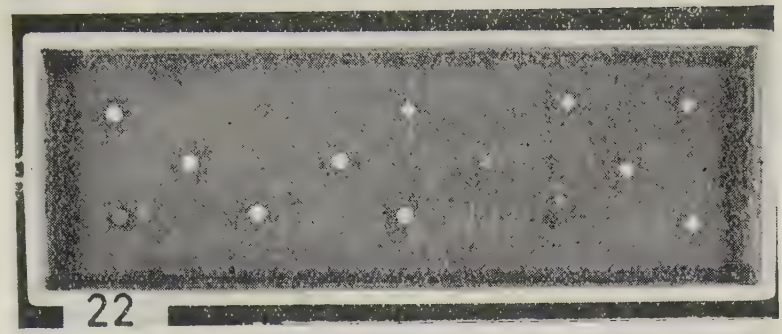


19

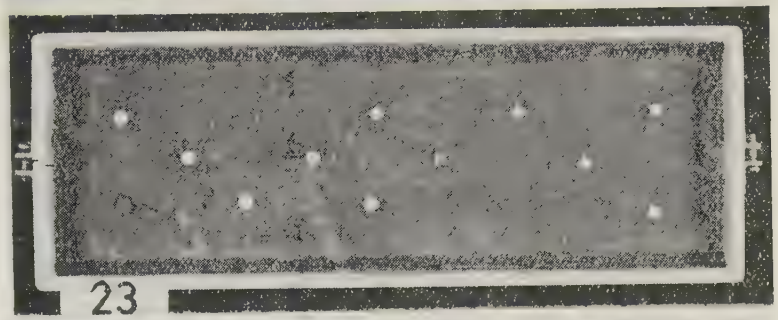
20



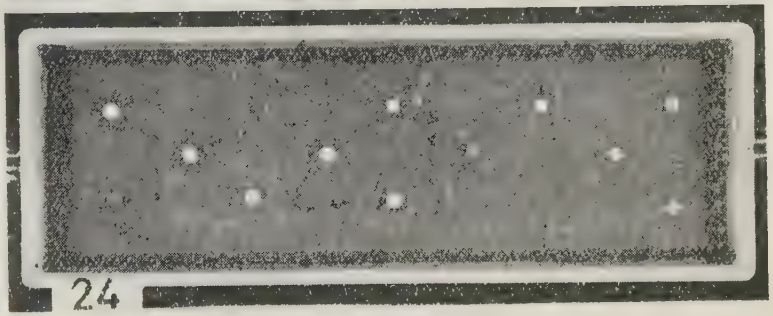
21



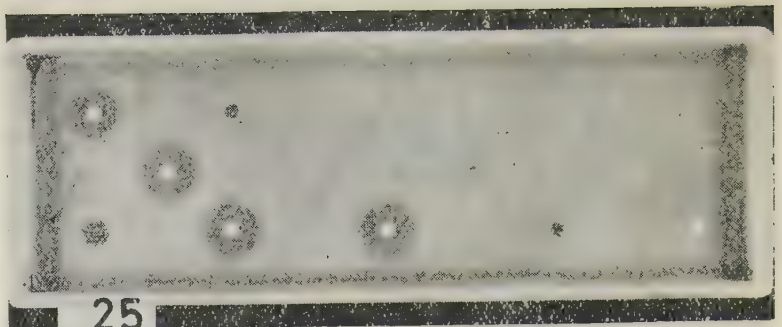
22



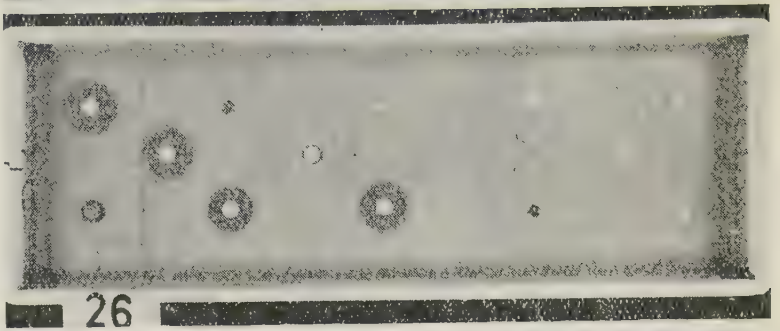
23



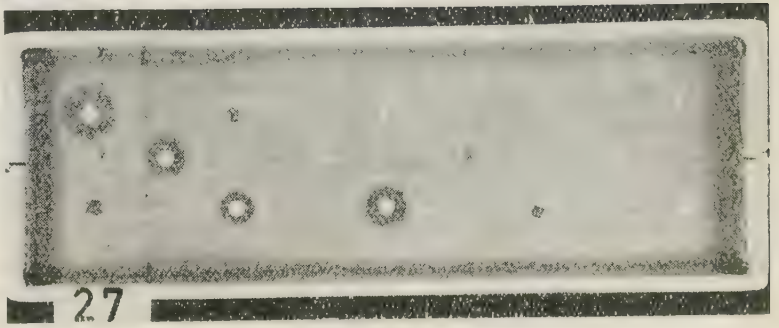
24



25

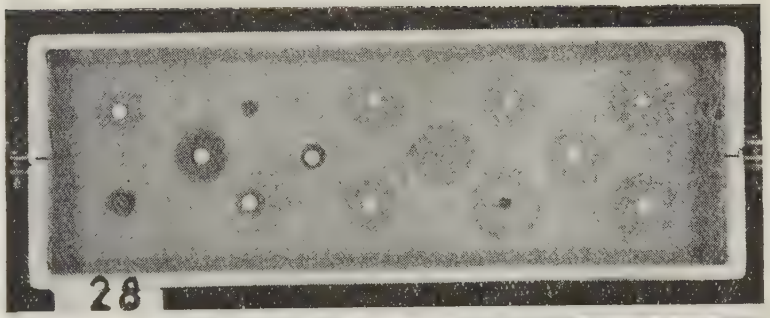


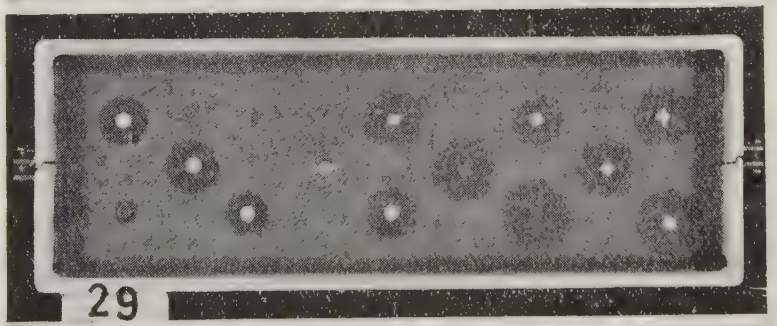
26



27

LÁMINA VII.





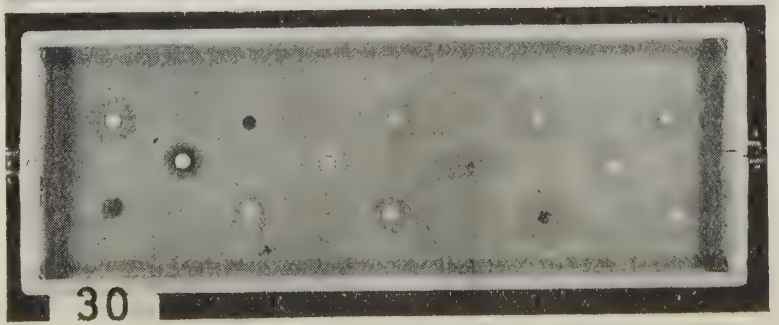
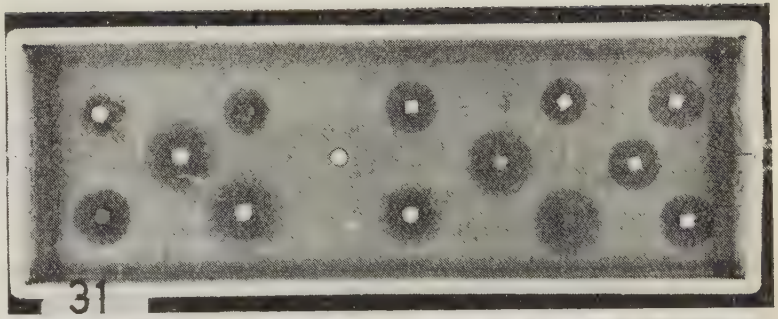
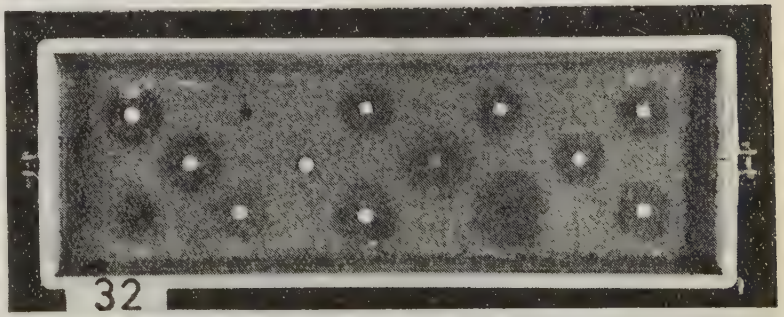


LÁMINA VIII.





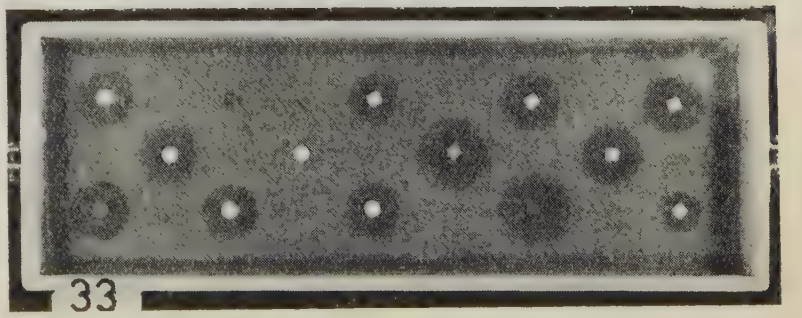
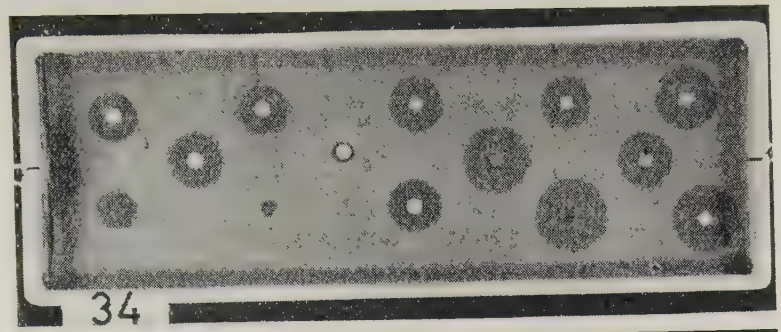
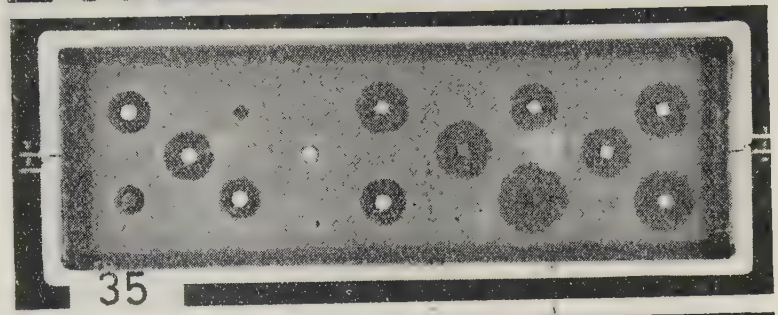


LÁMINA IX.





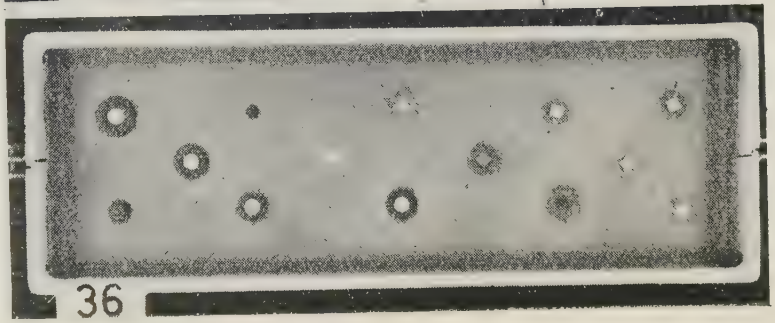
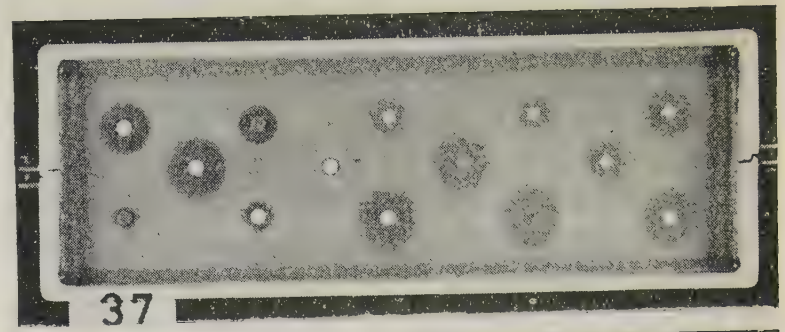
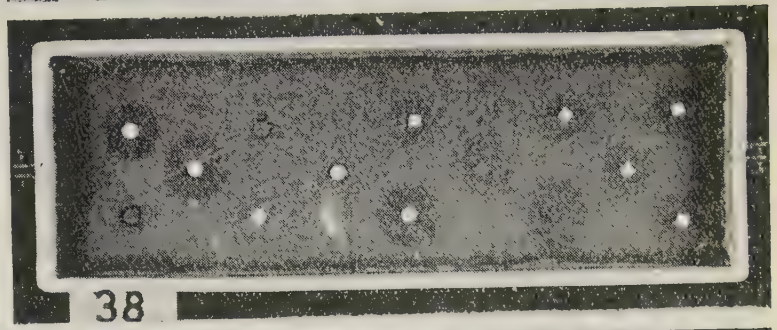


LÁMINA X.





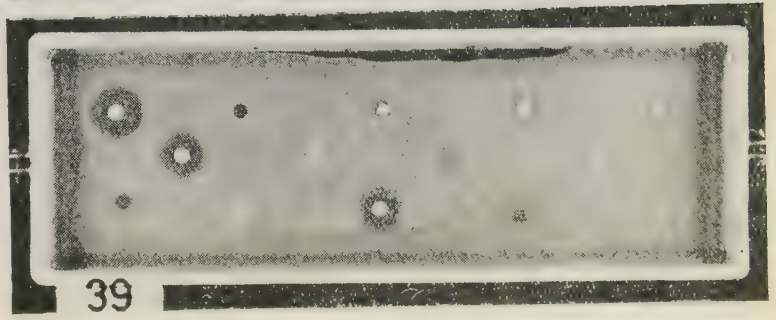
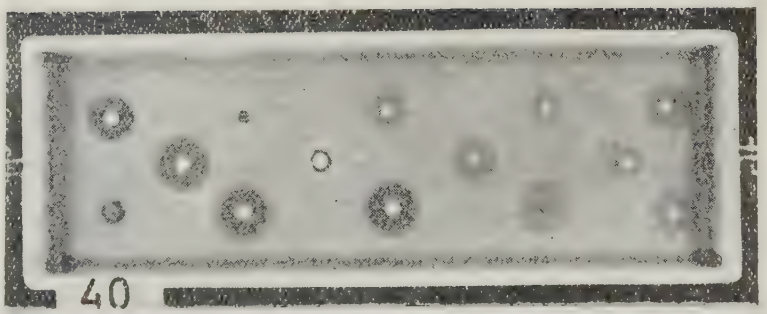
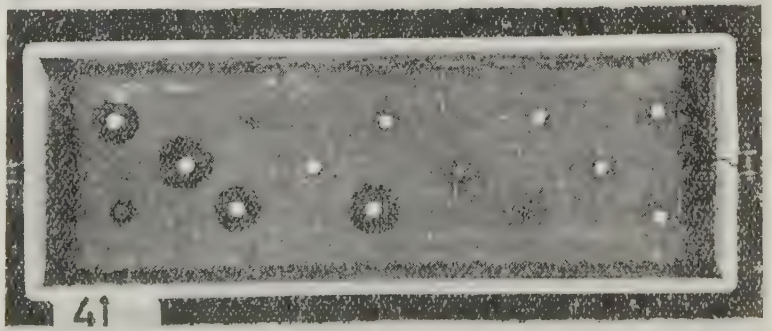


LÁMINA XI.





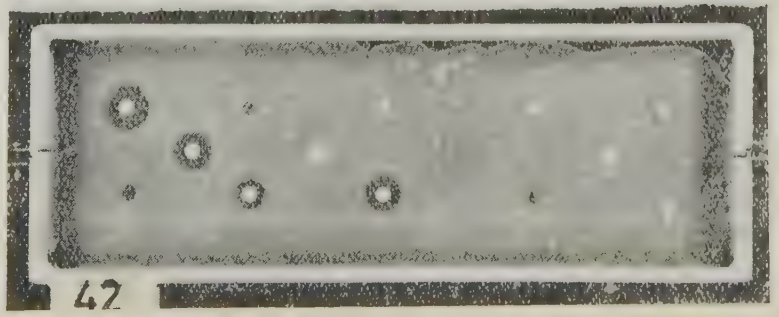
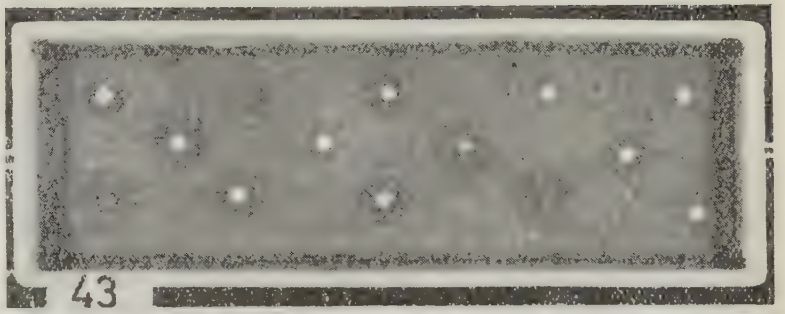
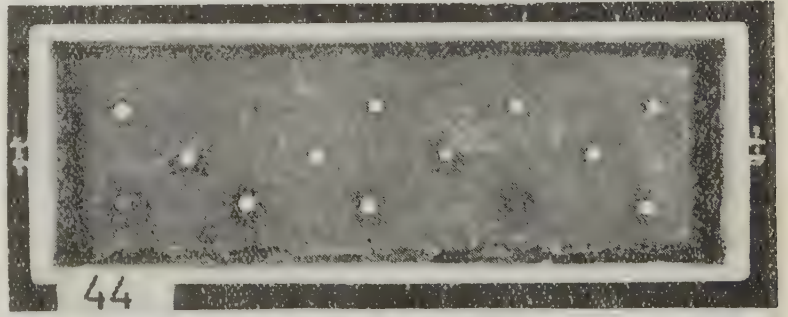


LÁMINA XII.





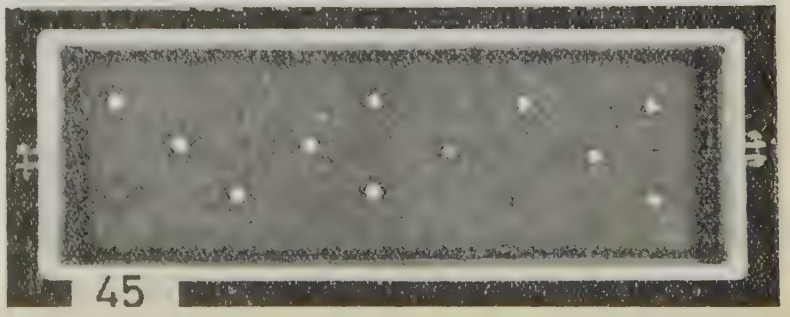


LÁMINA XIII.

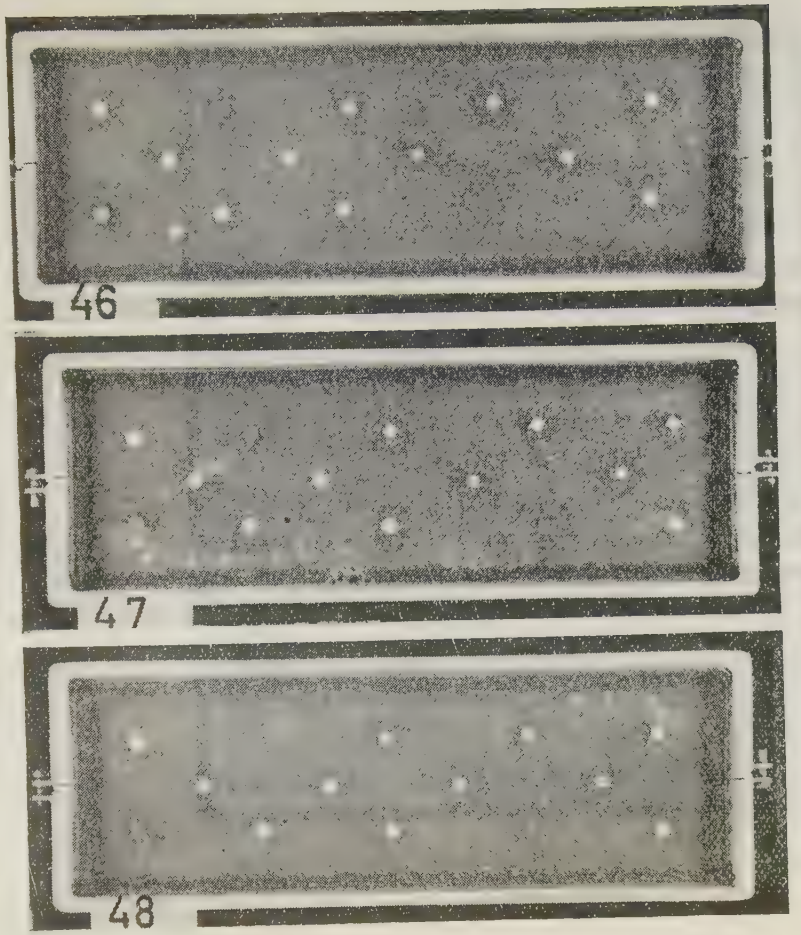


LÁMINA XIV.

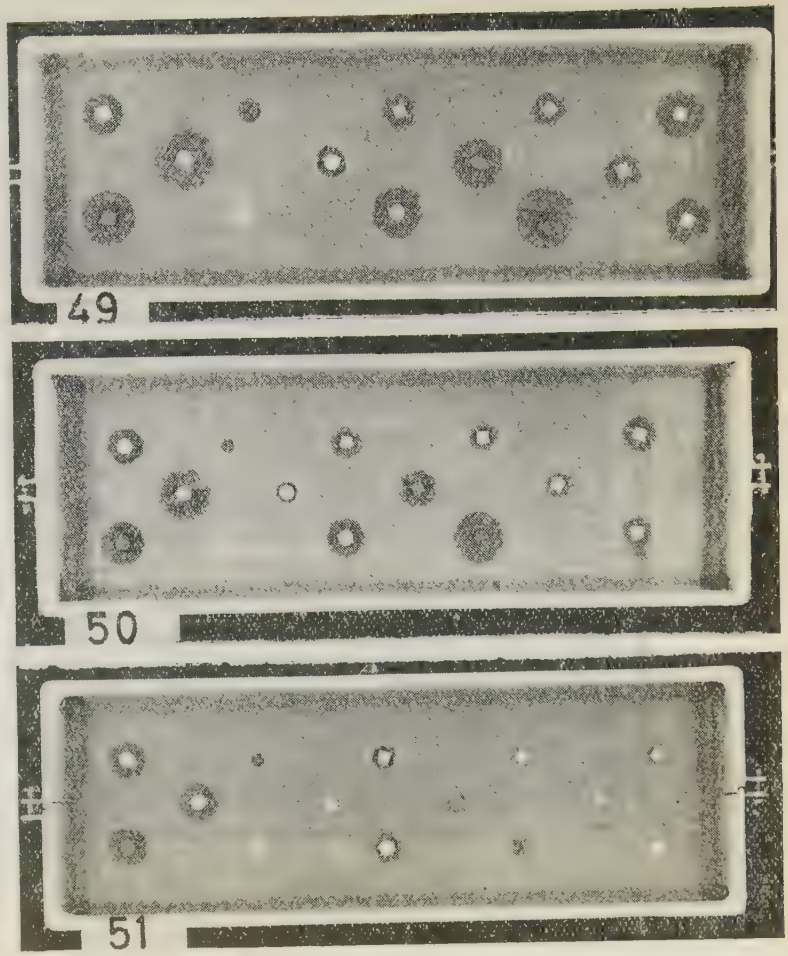
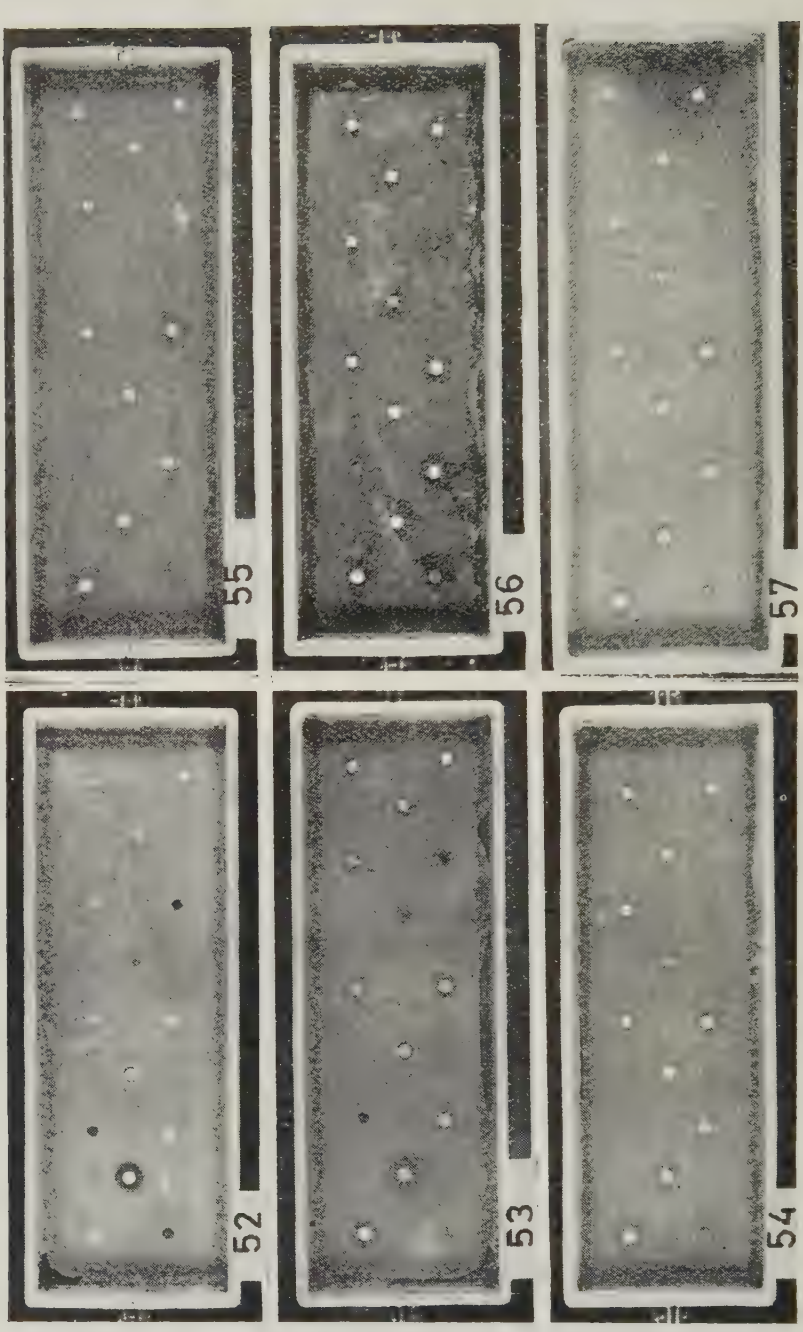


LÁMINA XV.



C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

UN NUEVO TIPO DE INCLUSIONES INTRACELULARES PRODUCIDAS POR VIRUS EN LAS PLANTAS

POR

MIGUEL RUBIO HUERTOS (*)

En 1950 describimos por primera vez la formación de inclusiones intracelulares en las plantas atacadas por el virus *Brassica* 1 (anillo negro de la col «Cabbage black ring»).

En posteriores estudios histológicos de plantas infectadas con este virus, *Brassica* 1, encontramos un nuevo tipo de inclusiones intracelulares junto con las ya estudiadas. Este nuevo tipo de inclusiones es diferente de los tipos conocidos y su descripción constituye el objeto de este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

La estirpe del virus *Brassica* 1 nos fué amablemente facilitada por el doctor C. M. Tompkins del «Departament of Plant Pathology» de la Universidad de Berkeley (California, EE. UU.). El virus fué inoculado mecánicamente con la ayuda de carborundum a *Brassica chinensis, Br. campestri* y *Br. rapa.* El estudio histológico lo hicimos sobre estos materiales cuando la infección estaba ya muy avanzada, es decir, cuando aparecían en las hojas síntomas necróticos, además del mosaico fuerte que se produce al principio de la infección.

Empleamos arrancamientos y cortes de inclusiones en parafina. Las tinciones, principalmente, fueron hechas con floxina al 1 por 100 y floxina

(*) Este trabajo ha sido efectuado con una beca del «Institute of International Education» en el «Detp. of Plant Pathology» de la Universidad de California, Berkeley. El autor desea expresar su agradecimiento al doctor T. E. Rawlins, bajo cuya supervisión ha trabajado, y al doctor C. M. Tompkins, por sus sugerencias y prestación del material infectado.

verde de metilo, en material fijado y sin fijar, y el reactivo de Feulgen (Schiff) para tinción de ácido dexosiribonucleico. También hicimos observaciones en arrancamientos en vivo, sin teñir, simplemente ajustando la apertura del diafragma del microscopio hasta conseguir que la visión fuese adecuada.

RESULTADOS

Entre los quince y veinticinco días de la inoculación con el virus *Brassica* 1 las hojas nuevas de la planta infectada presentan un fuerte mosaico y en sus células epidérmicas encontramos inclusiones del tipo ya descrito, consistentes en masas amorfas, refringentes, que se tiñen muy

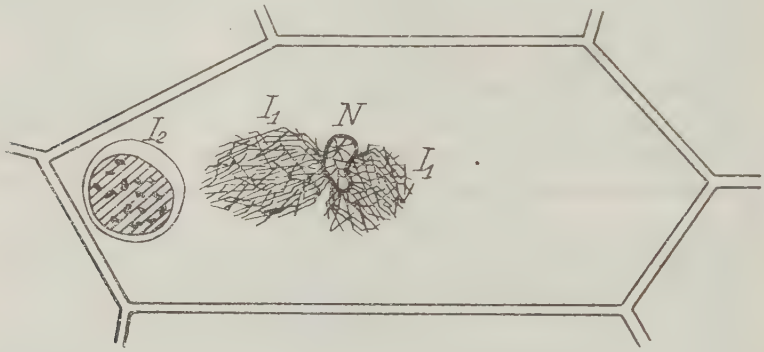


FIG. 1.

bien con floxina al 1 por 100 y con los demás colorantes usuales. Estas masas amorfas, que generalmente se sitúan al lado del núcleo de la célula, se hacen más tarde fibrosas. Estas fibras, observadas al microscopio electrónico, hemos visto que se componen de partículas de virus orientadas en el sentido longitudinal de la fibra (Rubio Huertos, 1950, 1956).

Cuando el mosaico fuerte se hace más acentuado y empiezan a aparecer algunas áreas necróticas en las hojas (treinta a cuarenta días), junto con las inclusiones antes descritas aparecen otras de aspecto completamente distinto, y que se pueden ver evolucionar en unos días, siendo a veces posible ver los pasos de la evolución en un mismo corte que abarque tejido verdoso, amarillento y necrótico. Así, al principio nos

encontramos con unas inclusiones perfectamente esféricas, con una membrana muy destacada y al parecer rellenas de un flúido en el que se pueden distinguir dispersos algunos gránulos que, a veces, forman barritas refringentes. El aspecto de las inclusiones en esta fase es como el de un núcleo, dos a tres veces mayor que uno normal en este tipo de células, con los cromosomas en metafase; tanto es así, que al principio pensamos en si se trataría de los núcleos de las células que habían alcanzado este tamaño y tomado ese aspecto bajo la influencia del virus. Para salir de dudas, teñimos con el reactivo de Feulgen, comprobando que, tanto estas inclusiones como las primeramente descritas, no se tiñen, y, en cambio, aparecía el verdadero núcleo perfectamente coloreado en rojo violáceo, distorsionado y comprimido entre las masas fibrosas de las inclusiones del primer tipo, por lo que era difícil de ver en las tinciones con floxina (fig. 1).

En una fase posterior se puede observar cómo el flúido que rellena el interior de la inclusión se espesa, se concreta, y los gránulos que se veían al principio se reúnen formando una especie de placa cristalina muy refringente, y que, observado el corte sin teñir, posee un color amarillento pajizo. Más adelante este cristal crece hasta llenar casi toda la inclusión, y el flúido que quedaba alrededor parece desaparecer, y con ello la membrana, que se continúa viendo perfectamente, comienza a encogerse, a retraerse, acoplándose a la forma del cristal, y se pueden observar arrugas en su superficie (fig. 2).

FIG. 2.

La última fase consiste en la desaparición de la membrana, no sabemos si por absorción o lisis, quedando entonces una inclusión de aspecto cristalino libre. El color amarillo de la inclusión en esta fase aumenta, se hace más intenso y se extiende al contenido de toda la célula, necrosándose toda ésta en pocos días.

DISCUSION

Las inclusiones intracelulares, hasta ahora conocidas, producidas por virus en las plantas, se pueden agrupar en un reducido número de grupos en cuanto a su morfología, y, en las que ésta es conocida, también en su formación y composición. Así, de una manera esquemática, tenemos el siguiente cuadro:

INCLUSIONES INTRACELULARES

	ESTRUCTURA	FORMA	FORMACIÓN	EJEMPLO DE VIRUS QUE LES PRODUCE
Inclusiones intranucleares.	Cristalina.	Placas rectangulares.	?	«Severe echt» virus *Phaseolus* virus 2.
Inclusiones intracitoplásmicas.	Cristalina.	Placas hexagonales agujas.	?	Estirpes de virus Mosaico del tabaco.
»	Amorfa.	Ameboides.	?	Virus Mosaico del tabaco.
»	»	Id.	A partir de plastidios.	Virus amarillo de la *Brassica*.
»	»	Granulares.	Por reunión de gránulos refringentes en una masa.	Virus Aucuba del tomate.
»	»	Fibrosas.	Id.	Virus *Brassica* 1. Primer tipo.
»	»	Compactas no vacuoladas.	Por crecimiento interno.	Virus *Brassica* 3.
»	»	Esféricas no granulares que se tiñen con el reactivo de Feulgen.	?	Virus «wound tumor».

La formación de las inclusiones cristalinas del virus Mosaico del tabaco no ha sido bien estudiada, pero parece ser que en las células aparecen en un momento dado (diez-doce días) pequeñas placas cristalinas, que luego se hacen mayores, alcanzando su máximo tamaño a partir de los dieciocho días de la infección; unos treinta a cuarenta días más tarde se ve cómo estas grandes placas cristalinas empiezan a desintegrarse, acabando por desaparecer las inclusiones. No ha podido observarse en ellas indicios de membrana, tanto vistas al microscopio corriente como al microscopio electrónico, donde se ha podido comprobar que están formadas por partículas de virus ordenadas de forma regular (8,13).

Tampoco ha sido descrita membrana envolvente alguna en los demás tipos de inclusiones cristalinas («severe echt»).

Inclusiones amorfas.

Por el cuadro anterior vemos que dentro de la denominación amorfa o cuerpos X existen una serie diferente de tipos de inclusiones no ya sólo distintas en su forma o estructura, como es el que sean ameboides, granulares, etc., sino también en su modo de formación y composición. Este hecho apenas ha sido tenido en cuenta hasta ahora. De todas formas, la clasificación de estos cuerpos X no es tan sencilla como pudiera parecer a primera vista, y es preciso hacer algunas aclaraciones al cuadro esquemático puesto anteriormente: existen algunos cuerpos X de tipo granular, por ejemplo, los producidos por los virus Aucuba y «Severe echt», en los que, dentro de su estructura granular, aparecen pequeñas placas cristalinas que, en el caso del virus Aucuba del tomate, llegan a formar en su totalidad una inclusión cristalina típica. Claro que esto es una excepción, y refiriéndonos a los cuerpos X como aparecen en general, se puede decir que responden claramente a la clasificación antedicha.

Las inclusiones producidas por el virus *Brassica* 1 del segundo tipo que hemos descrito se salen completamente de los tipos clasificados y anteriormente conocidos. La claridad con que en estas inclusiones aparece su membrana externa, el modo de formarse la inclusión de aspecto cristalino, final, que hemos seguido paso a paso, y hasta el color amarillo de que están impregnadas naturalmente, lo cual puede indicar una composición química también diferente de la proteínica general de los otros tipos, son cosas nunca observadas en los otros tipos de inclusiones.

Otro punto interesante que aparece en el estudio de estas inclusiones es su íntima relación con la necrosis progresiva del tejido de la hoja infectada, puesto que se encuentra solamente cuando comienza el período necrótico en los tejidos foliares, y ellas mismas parecen ser las que originan los focos de los cuales parte la sustancia que ha de invadir la célula causando su destrucción por necrosis.

RESUMEN

Se describe un nuevo tipo de inclusiones intracelulares asociadas con el virus *Brassica* 1 («Cabbage black ring»), cuyas características muy particulares, tales como el poseer una membrana perfectamente definida y el aparecer dentro de esta inclusión vacuolar un cuerpo de aspecto cristalino que queda libre por desaparición de la membrana, las hacen completamente distintas de todos los tipos de inclusión descritos hasta ahora en infecciones por virus en las plantas.

Estas inclusiones se encuentran junto con las de tipo fibroso o cuerpos X ya descritas ateriormente en este virus.

SUMMARY

Cabbage black ring virus (*Brassica* virus 1) is known to produce X bodies of fibrous type; a new vesicular type is now described. This type of inclusion is formed in a late stage of infection when the host plant shows necrotic lesions. They are spherical or ovoid and show a distinct outer membrane which in a late stage dissapear leaving a crystal-like body intact.

BIBLIOGRAFIA

(1) Bawden, F. C., F. M. L. Sheffield. 1939. The intracellular inclusions of some plant virus diseases. Ann. Appl. Biol. 26: 102-115.

(2) Berkeley, G. H., M. Weintraub. 1952. Turnip mosaic. Phytopathology. 42: 258-260.

(3) Iwanowski, D. 1903. Uber die mosaikkrankheit der Tabakspflanze. Ztschr. f. Pflanzenkrank. 13: 1-41.

(4) Littau, V. C., Black, L. M. 1952. Spherical inclusions in plant tumors caused by a virus. American Journal of Botany. 39.1. 87-94.

(5) McWhorter, F. P. 1941. Isometic crystals producced by *Pisum* virus 2 and *Phaseolus* virus 2. Phytopathology. 31. 760-761.

(6) Rodríguez Sardiña, J.: Martínez Cordón, F.; Rubio Huertos, M. 1949. Consideraciones acerca de las técnicas de tinción de inclusiones en las virosis vegetales. Bol. Pat. Agric. 16. 311-320.

(7) Rubio Huertos, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. Microbiol. Española. 3: 207-232.

(8) Rubio Huertos, M. 1954. Rapid extraction of intact crystalline inclusions from the cells of plants infected with tobacco mosaic virus. Nature (London). 174: 313.

(9) Rubio Huertos, M. 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopathology. 46: 553-556.

(10) Sheffield, F. M. L. 1931. The formation of intracellular inclusions in solanaceous hosts infected whith aucuba mosaic of tomato. Ann. App. Biol. 4: 471-493.

(11) Sheffield, F. M. L. 1934. Experiments bearing on the nature of intracellular inclusions in plant virus diseases. Ann. App. Biol. 21: 340-453.

(12) Sheffield, F. M. L. 1947. The virus in the plant cell. Proc. -6th Intern. Congress. Exp. Cytol. 178-182.

(13) Stere, R. L.; R. C. Williams. 1953. Identification of crystalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected whit tobacco mosaic virus. Amer. Jour. Bot. 40: 81-84.

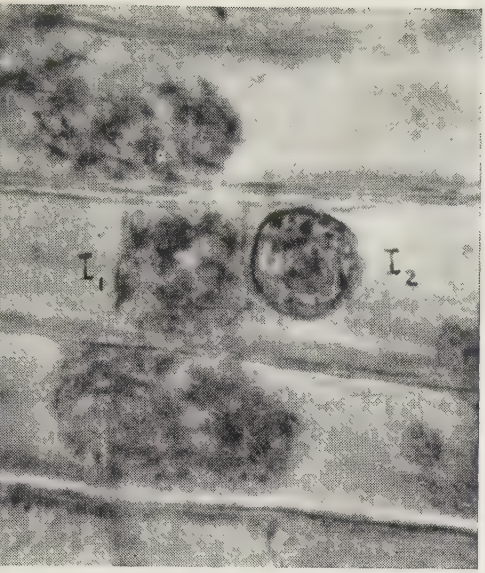


Foto 1.

os dos tipos de inclusiones: I_1, ya descritas, e I_2, descritas ahora en este trabajo.

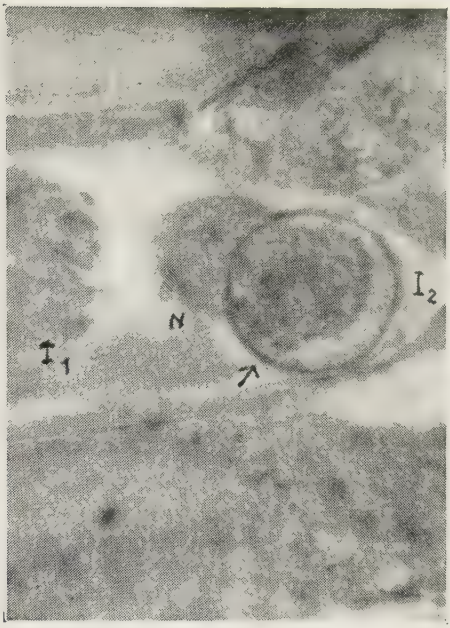


Foto 2.

I_2, inclusión vesicular en la cual se ve claramente la presencia de una fuerte membrana.

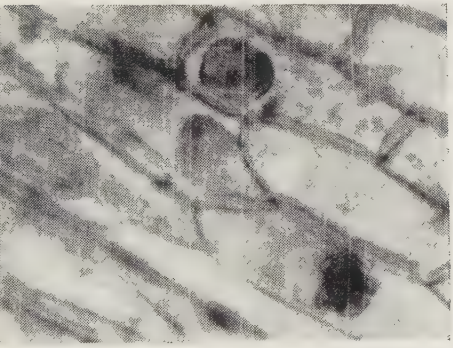


Foto 3.

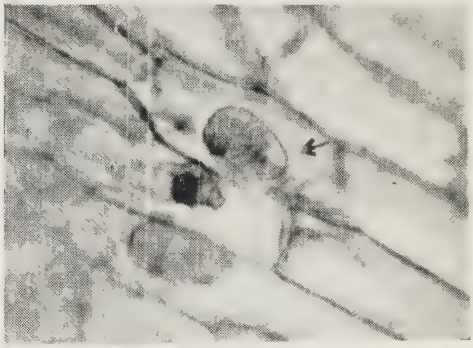


Foto 4.

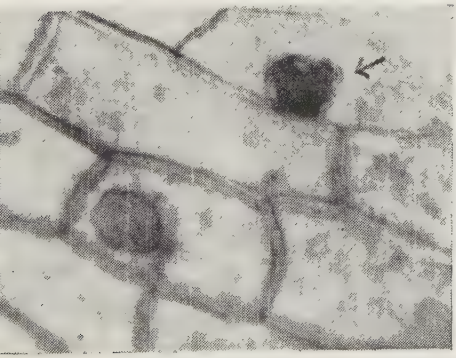


Foto 5.

Fotos 3, 4 y 5.

Diferentes fases de la evolución de las inclusiones vesiculares.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN» DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

IDENTIFICACION DE BACTERIOFAGOS MEDIANTE TECNICAS SEROLOGICAS

II. Bacteriófagos procedentes de personas afectas de infección del aparato urogenital.

POR

M.ª Luisa Alonso

Este artículo corresponde, como puede desprenderse del enunciado, a la investigación de bacteriófagos y titulación serológica de los mismos mediante las técnicas descritas en la primera parte del trabajo.

De un grupo de 43 se han seleccionado nueve enfermos, en los que por análisis bacteriológico de su sedimento urinario se identificaron distintas especies de *Escherichia coli*.

Los resultados y trabajo experimental se detallan a continuación:

I. CASOS CLINICOS EXAMINADOS

Caso núm. 1.

P. O..., mujer de setenta años, a consecuencia de enfermedad con cuadro disenteriforme, presenta cistitis rebelde a los antibióticos. En el sedimento urinario se aíslan bacilos Gram negativos.

Caso núm. 2.

L. G..., niño de once años, proceso nefrítico subsiguiente a una varicela, en orina se aíslan bacilos Gram negativos y estreptococos.

Caso núm. 3.

R. F..., mujer de treinta y dos años, presenta cistitis post-embarazo, con bacilos Gram negativos en su orina.

Caso núm. 4.

R. C..., hombre de cuarenta años, diagnosticado de pielonefritis re-

belde a los antibióticos, cuya causa perece ser un colibacilo asociado a estreptococos del grupo O.

Caso núm. 5.

T. L..., mujer de veintiocho años, padece cistitis provocada por infección colibacilar.

Caso núm. 6.

B. B..., niña de siete años, nefropatía de etiología desconocida.

Caso núm. 7.

M. A..., niña de cinco años, con vulvovaginitis provocada por un bacilo Gram negativo.

Caso núm. 8.

S. O..., mujer de treinta años, cistitis post-embarazo, y de cuya orina se aislaron bacilos Gram negativos.

Caso núm. 9.

C. E..., hombre de sesenta y dos años, infección de vías urinarias subsiguiente a prostatectomía, en el que parece aislarse como agente causal un colibacilo.

II. CUADROS Y RESULTADOS

En estas experiencias para aislar los bacteriófagos hemos recurrido exclusivamente al *E. coli*, prescindiendo de los gérmenes *S. typhi*, *S. paratyphi* A y B que empleamos en el trabajo anterior para mayor seguridad.

En el cuadro núm. 1 damos los resultados del aislamiento de estos fagos sobre *E. coli*.

En el núm. 2 la titulación de los fagos ya una vez purificados y enriquecidos, y en el núm. 3 los resultados de las pruebas de neutralización cruzadas de estos fagos y los sueros inmunes obtenidos.

CUADRO I

AISLAMIENTO DE LOS BACTERIÓFAGOS SOBRE «E. COLI»

DILUCIONES	Puro	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Fugo núm. 1 ...	Cl	Cl	Cl-	++	+	5	0		
Fago núm. 2 ...	Cl	Cl-	+++	+	15	0			
Fago núm. 3 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	+++	++	+	0	
Fago núm. 4 ...	Cl	Cl	Cl-	+	2	0			
Fago núm. 5 ...	Cl	Cl-	++	15	0				
Fago núm. 6 ...	+++	++	+	10	0				
Fago núm. 7 ...	Cl	+++	+	0					
Fago núm. 8 ...	Cl	Cl	Cl	+++	+	7	0		
Fago núm. 9 ...	Cl	Cl	Cl	Cl-	++	+	1	0	

CUADRO II

TITULACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS, PURIFICADOS, SOBRE «E. COLI»

DILUCIONES	Puro	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Fago núm. 1 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl-	10	0	
Fago núm. 2 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	+++	+	5	0
Fago núm. 3 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl-	++	11	0	
Fago núm. 4 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	++ ++	+++	+	7	0
Fago núm. 5 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	++	+	1
Fago núm. 6 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl-	+ ++	18	2	0
Fago núm. 7 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	+ ++	++	+
Fago núm. 8 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl-	.++	+	12	0
Fago núm. 9 ...	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl-	+++	++	5

CUADRO III

PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA ENTRE LOS FAGOS ESTUDIADOS Y LOS ANTI-FAGOS CORRESPONDIENTES

SUEROS ANTI-FAGOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Fago núm. 1 ...	+	—	—	—	+	+	—	—	—
Fago núm. 2 ...	—	+	—	+	—	—	—	—	+
Fago núm. 3 ...	+	—	+	—	—	—	—	+	—
Fago núm. 4 ...	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Fago núm. 5 ...	+	—	—	—	+	+	—	—	+
Fago núm. 6 ...	+	—	—	—	+	+	—	—	—
Fago núm. 7 ...	—	—	—	—	+	+	+	—	—
Fago núm. 8 ...	—	—	+	—	—	—	—	+	
Fago núm. 9 ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+

III. INTERPRETACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Del estudio de estas reacciones cruzadas de los fagos y de los sueros anti-fagos podemos concluir:

Los fagos núm. 1 y núm. 6 son idénticos, dan reacciones cruzadas al mismo título.

El fago núm. 2 es diferente de todos los demás y próximo pariente de los fagos núms. 4 y 9, por dar una reacción con los anti-fago números IV y IX.

El fago núm. 3, próximo pariente del 1 y casi idéntico al núm. 8, por dar con él reacciones cruzadas.

El fago núm. 4, diferente de todos y próximo pariente del núm. 2, como ya hemos indicado.

El fago núm. 5 resulta casi idéntico a los fagos núms. 1 y 6, pero da además una reacción con el suero núm. IX.

El fago núm. 7, distinto del resto y próximo pariente de los 5 y 6, por dar reacciones con sus sueros anti-fago correspondientes.

El fago núm. 8, reacciones cruzadas con el fago núm. 3, pero no da ninguna con el núm. 1.

El núm. 9 es próximo pariente de los fagos núms. 2 y 5, con los que da una reacción su suero anti-fago, pero no así él con sus sueros respectivos.

IV. RESUMEN

Se han aislado nueve bacteriófagos a partir de heces procedentes de enfermos con afecciones de tipo génito-urinario.

Se identifican como fagos del *E. coli.*

Se preparan los sueros anti-fago correspondientes.

Se estudian y establecen, mediante pruebas de neutralización, las relaciones que guardan entre sí estos fagos.

V. SUMMARY

Nine bacteriophages have been isolated from feces of patients suffering of genito-urinary type afections.

They were identified as «fagos» of *E. coli*

The correspondent serums anti-phago have been prepared.

Experiments on neutralization have been done in order to establish the mutual relations between these phagos.

LABORATORIO EXPERIMENTAL DE TERAPEUTICA INMUNOGENA
BARCELONA

¿LA *SALMONELLA TYPHICA* ADQUIERE RESISTENCIA FRENTE AL CLORAMFENICOL?

POR

J. VIDAL MUNNÉ y J. VIDAL TORT.

Es sabido que muchos antibióticos crean razas de gérmenes con acusada resistencia, demostrable *in vivo* por la ineficacia del tratamiento, e *in vitro* por la tolerancia del fármaco en los medios de cultivo.

Con relación al cloramfenicol, la literatura internacional, en su mayoría, se decide en aceptar que este antibiótico no da en los tratamientos de la fiebre tifoidea ocasión de crear estirpes microbianas con acusada tolerancia.

Sin embargo, un trabajo aparecido en «The Lancet» (1) asegura haber aislado de un enfermo tratado con cloramfenicol un germen que poseía una marcada resistencia, en relación con el mismo microbio aislado del mismo paciente antes de establecerse el tratamiento con el antibiótico en cuestión. Se trata únicamente de un solo caso, y el estudio ha sido hecho exclusivamente con los bacilos Eberth aislados del mismo enfermo.

Nuestro trabajo, orientado a resolver esta cuestión de indudable interés clínico, es un poco más amplio, ya que paralelamente a los gérmenes procedentes de tifódicos con recidiva, después de un normal tratamiento con cloramfenicol, hemos estudiado un grupo de microbios aislados de enfermos antes de todo tratamiento.

Hemos estudiado las cantidades mínimas de antibiótico que, disueltas en el medio de cultivo, establecen una completa inhibición de toda posible germinación. Al mismo tiempo, y permaneciendo los tubos en la estufa a 37°, se hacen resiembras cada veinticuatro horas, hasta comprobar una esterilización definitiva del cultivo sembrado.

De manera que nuestra experiencia fija las cantidades iniciales de

(1) J. COLGUHOUN, R. S. Weetch., nov. 25, 1950, p. 621.

inhibición, y demuestra que un contacto más o menos prolongado consigue una perfecta esterilidad.

A partir de cultivos de *Salmonella typhica* en medio líquido, se hacen siembras en tubos de caldo conteniendo concentraciones variables de cloramfenicol. Cada muestra de germen a estudiar es sembrado, una gota de capilar, en cuatro tubos de caldo que contienen, respectivamente, 14, 28, 42 y 56 mgrs. de antibiótico, y cada veinticuatro horas una gotita tomada con el asa de platino es extendida en la superficie de los tubos de agar.

Estas siembras se repiten durante cinco días, tope máximo de germinación que hemos observado en nuestros ensayos.

Nuestras anotaciones de resultados son simplificadas así: ++, más de 50 colonias en el tubo de agar; + = menos de 50 colonias en el tubo de agar, y 0 = ausencia de cultivo.

Mientras han durado los ensayos, los tubos conteniendo cloramfenicol han mantenido la apariencia de caldo sin cultivar. Su transparencia inicial no se ha visto modificada por la gota de siembra.

Se han estudiado 18 cepas de *Salmonella typhica* procedentes de enfermos que no habían recibido medicación antibiótica (Cuadro I). Seis cepas de enfermos que después de un tratamiento corriente con cloramfenicol han presentado una evidente recidiva (Cuadro II). Además, hemos podido estudiar el comportamiento de dos cepas de este germen que fueron aisladas de enfermos con recidiva antes de todo tratamiento específico (Cuadro III).

Todo este material microbiano procede del Hospital de Infecciosos de esta ciudad.

Todas las cepas han sido cuidadosamente identificadas por serología y por su comportamiento en medios de diferenciación.

Como complemento de los métodos rutinarios de clasificación, todos estos gérmenes han sido estudiados en el Departamento de Bacteriología del Instituto Pasteur por el doctor Pierre Nicolle. Poseemos, pues, su lisotipia y su biotipia. Por lo tanto, el rigor inicial de la experiencia creemos que es aceptable.

En los cuadros que se acompañan resumimos resultados de nuestra experiencia final. Los protocolos de las investigaciones para precisar la técnica empleada no creemos ser necesario detallarlos, a pesar de las complicaciones surgidas hasta conseguir el *modus operandi* definitivo, que queda ya descrito con suficiente precisión.

Durante toda la experiencia los tubos de caldo conteniendo la siembra con su antibiótico han permanecido en la estufa a 37°, como asimismo las resiembras verificadas en agar.

Se han hecho ensayos para comprobar la capacidad germinativa de las colonias salidas en los tubos de agar procedentes de resiembras con las más altas concentraciones de cloramfenicol.

En todos ellos hemos visto que la germinación, aparentemente, no presentaba modificaciones que hicieran pensar en alteraciones provocadas por la pervivencia con el antibiótico. Los gérmenes escapados de su acción letal parecen comportarse normalmente.

CUADRO I

Germen	Microgr. de cloramfenicol	CULTIVOS 24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.
Núm. 368	14	0	0			
	28	0	0			
	42	0	0			
	56	0	0			
Núm. 408	14	0	0			
	28	0	0			
	42	0	0			
	56	+	0			
Núm. 415	14	++	+	+	0	0
	28	++	+	+	0	0
	42	++	++	+	+	0
	56	++	++	+	+	0
Núm. 431	14	++	++	+	0	0
	28	++	++	+	0	0
	42	++	++	++	+	0
	56	++	++	+	0	0
Núm. 435	14	++	+	+	0	
	28	++	+	+	0	
	42	++	++	+	0	
	56	++	++	+	0	
Núm. 439	14	++	++	0	0	
	28	++	++	+	0	
	42	++	++	+	0	
	56	++	++	0	0	

Germen	Microgr. de cloramfenicol	CULTIVOS 24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.
Núm. 428	14	+ +	+ +	+ +	+ +	+
	28	+ +	+ +	+ +	+	+
	42	- -	- +	+ +	+	0
	56	+ +	+ +	+ +	+	0
Núm. 429	14	+ +	+ +	+	+	+
	28	+ +	+ +	+	+	+
	42	+ +	+ +	+	+	+
	56	+ +	+ +	+	+	+
Núm. 430	14	+ +	+ +	+ +	+	0
	28	+ +	+ +	+ +	+	0
	42	+ +	+ +	+ +	+	0
	56	- +	+ +	+	0	0
Núm. 432	14	+ +	+ +	+ +	+	0
	28	+ +	+ +	+ +	+	0
	42	+ +	+ +	+ +	+	0
	56	+	+	+	+	+
Núm. 433	14	+ +	+ +	+ +	0	0
	28	+ +	+ +	+ +	+	0
	42	+ +	+ +	+ +	+	0
	56	+ +	+ +	+ +	+	0
Núm. 434	14	+ +	+ +	+	+	0
	28	+ +	+ +	+	+	0
	42	+ +	+	+	+	0
	56	+ +	+	0	+	0
Núm. 444	14	+ +	+ +	+	+	0
	28	- -	+ +	-	-	0
	42	+ +	+ +	+ +	+	+
	56	+ +	+ +	+ +	+	0
Núm. 445	14	+ +	+	+	0	0
	28	+ +	+ +	+	0	0
	42	+ +	+ +	+	0	0
	56	+ +	+ +	0	0	0
Núm. 446	14	+ +	+ +	+	+	0
	28	+ +	+ +	+ +	0	0
	42	+ +	+ +	+ +	+	+
	56	+ +	+ +	+ +	0	0
Núm. 447	14	- +	+	+	0	0
	28	+ +	+ +	+	0	0
	42	+ +	+ +	+	0	0
	56	+ +	+ +	0	0	0

Germen	Microgr. de cloramfenicol	CULTIVOS 24 h.	42 h.	72 h.	96 h.	120 h.
Núm. 448	14	++	++	+	+	0
	28	++	++	+	+	0
	42	++	++	++	0	0
	56	++	++	++	0	0
Núm. 449	14	++	++	+	0	0
	28	++	++	+	0	0
	42	++	++	+	0	0
	56	++	++	+	0	0

CUADRO II

Germen	Microgr. de cloramfenicol	CULTIVOS 24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.
Núm. 298	14	++	+	0	0	
	28	++	++	0	0	
	42	++	+	0	0	
	56	++	++	0	0	
Núm. 384	14	+	+	+	0	
	28	++	++	+	0	
	42	++	++	−	0	
	56	++	++	+	0	
Núm. 285	14	++	+	0		
	28	++	+	0		
	42	++	+	0		
	56	++	+	0		
Núm 267	14	++	++	+	0	
	28	++	+	0	0	
	42	++	+	0	0	
	56	++	+	0	0	
Núm. 232	14	++	+	0	0	
	28	++	++	+	0	
	42	++	++	+	0	
	56	++	++	+	0	
Núm. 342	14	++	+	0	0	
	28	++	++	+	0	
	42	++	++	+	0	
	56	++	++	+	0	

CUADRO III

Germen	Microgr. de cloramfenicol	CULTIVOS 24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.
Núm. 280						
(Corresponde al núm. 285 antes de ningún tratamiento.)	14	++	+	0	0	0
	28	++	+	+	0	0
	42	++	+	+	0	0
	56	++	++	+	0	0
Núm. 380						
(Corresponde al núm. 384 antes de ningún tratamiento.)	14	++	+	+	0	0
	28	++	+	0	0	0
	42	++	++	0	0	0
	56	++	++	+	0	0

Como puede verse por los cuadro anteriores, la *Salmonella typhica* tiene una resistencia muy variable frente al cloramfenicol.

Las dosis de fármaco por nosotros utilizadas coinciden aproximadamente con las que encuentran normales otros investigadores.

Puede observarse que el comportamiento de los gérmenes aislados en las recidivas no es sensiblemente distinto al que vemos en los gérmenes que no estuvieron en contacto con el cloramfenicol.

Para mayor claridad de nuestra aseveración, obsérvese que las dos cepas de los enfermos con recidiva, aisladas antes del tratamiento, se han comportado prácticamente de una manera idéntica.

Comprendemos que nuestra estadística no es lo suficiente amplia para sentar conclusiones definitivas; pero es justo advertir que no es tarea fácil obtener cultivos en estas condiciones especiales.

Por nuestra parte podemos decir que llevamos dos años recogiendo *Salmonella typhica,* y hasta la fecha sólo han llegado a nuestras manos seis cepas con las características propias para ampliar nuestra investigación. Pasan de 200 los gérmenes recogidos y estudiados.

A pesar de nuestras reservas, creemos que el cloramfenicol no parece modificar las condiciones metabólicas de la *Salmonella typhica.*

Sospechamos más bien que un tratamiento prolongado, y especialmente asociado a una intensa terapéutica específica (vacunación, phagus, etcétera), disminuiría considerablemente el número de recidivas que se observan en la práctica hoy día habitual.

RESUMEN

Los autores de este trabajo estudian la acción del Cloramfenicol sobre gérmenes de *Salmonella typhica,* para investigar la posible resistencia de estos frente al antibiótico.

Describen la técnica empleada en sus experiencias y resumen en unos cuadros sinópticos los resultados obtenidos.

SUMMARY

In this paper the authors study the action of Cloramphenicol with germs of *Salmonella typhica,* to investigate the possible resistance of these germs in front of the antibiotic.

They describe the technics employed in their experiences and resume the results obtained in compendious tables.

INSTITUTO I. B. Y. S.
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

ESTUDIOS SOBRE PURIFICACION Y DESANTIGENIZACION ENZIMATICA DE SUEROS Y PLASMAS ANTITOXICOS

III. Estudio teórico de las valoraciones de la función antitóxica y anafiláctica de los sueros y plasmas antitóxicos.

POR

F. CORDÓN y A. MARTÍNEZ.

En un trabajo anterior (1) se hizo una exposición teórica de los problemas que plantea la preparación de productos antitóxicos elaborados (esto es, que posean el valor curativo y la inocuidad que exige el estado actual de la terapéutica) a partir de plasmas o sueros antitóxicos en estado nativo. Como es sabido, la propiedad del suero nativo de neutralizar la correspondiente toxina, propiedad en que radica la extraordinaria importancia de estos sueros—hoy por hoy insustituíbles—, es una función de una determinada fracción de proteínas del suero antitóxico. Una manera evidente de purificar un suero nativo es, pues, separar selectivamente de las moléculas proteicas con función antitóxica todas las moléculas de proteína que sean inactivas a este respecto; y aún más, como la función antitóxica puede quedar adscrita con toda su eficacia a un fragmento de la molécula de la proteína antitóxica nativa, tal purificación puede enunciarse con máxima generalidad como la *concentración de función antitóxica con respecto a la cantidad de material proteico del preparado terapéutico*. En dicho trabajo (1) se expone cómo hemos enfocado en nuestro laboratorio este primer aspecto de la purificación de sueros antitóxicos.

No hay que decir que el esfuerzo sostenido que viene haciéndose intentando forzar cada vez más esta purificación, lejos de ser superfluo o caprichoso, obedece a una necesidad ineludible. En efecto, todas las moléculas proteicas del suero terapéutico administradas parenteralmente (vía forzosa para la acción curativa) pueden dar lugar a trastornos inmediatos más o menos graves o preparar la aparición de tales trastornos con ocasión de una futura administración de preparados del suero. No cabe duda de que una fuerte purificación en el sentido dicho resultará

ventajosa en cuanto elimina una cantidad, mayor o menor, de material terapéuticamente inerte y, en cambio, potencialmente nocivo. Pero, por sí misma, ni incluso después de resuelta con la amplitud previsible con que se plantea en (1), puede dejar solucionado el problema de la elaboración perfecta de sueros antitóxicos terapéuticos.

En efecto, la molécula soporte de la función antitóxica es una proteína y, como tal, capaz de ejercer—independientemente de su acción curativa—la actividad nociva (anafilactógena) general de las proteínas de que antes se habló; incluso pertenece a una fracción de seroproteínas (globulinas) que son particularmente activas a este respecto perjudicial. Por otra parte, al escindir la proteína-antitoxina nativa, el fragmento portador de la función antitóxica puede conservar también la cualidad nociva. Por consiguiente, el problema no se resolverá con todo rigor hasta que *no se consiga enriquecer sumamente la función antitóxica en relación a la función anafilactógena peligrosa.* Y, en último término, puede decirse que la purificación, en general, debe estudiarse usando como criterio fundamental la desaparición, para un número de unidades antitóxicas dadas, de la propiedad anafilactógena (ya que, en definitiva, esta propiedad es el único inconveniente de un suero nativo). En las páginas que siguen vamos a exponer el estado actual de los métodos para valorar ambas funciones antitóxica y anafilactógena; prestaremos especial atención, por las dificultades que hoy ofrece, al estudio de la última valoración, que consideraremos con el máximo rigor que nos sea posible. En una publicación ulterior expondremos nuestra experiencia y las perspectivas de nuestro trabajo relativas a los métodos para privar a un suero de la función anafilactógena sin destruir en él la capacidad antitóxica.

Según lo anterior, el problema de la preparación de sueros antitóxicos curativos consiste en someter los plasmas o sueros antitóxicos nativos a una elaboración tal que destruya su poder anafilactógeno y conserve, en cambio, la función anticuerpo. Es decir, hay que, 1, aplicar sobre los sueros nativos diversos agentes físicos o químicos de los que se espere dicha acción separadora en virtud de hipótesis de trabajo sugeridas por los conocimientos actuales de la naturaleza de la anafilaxia y de los anticuerpos; y 2, determinar sobre los productos resultantes los valores de las dos funciones dichas del suero. Como dijimos, dejaremos para otra comunicación el análisis de cuáles puedan ser los agentes que conviene ensayar y reservaremos ésta para el estudio del modo de seguir el efecto sobre una y otra función.

I

VALORACION DE LA FUNCION ANTITOXICA

Es evidente que cualquiera que sea el agente a que se someta un suero nativo para privarle de su carácter anafiláctico, hay que ver el efecto simultáneo que dicho agente va ejerciendo sobre la función anticuerpo (que se beneficia del suero), dado que se desconoce en qué consiste la modificación de una globulina normal en globulina anticuerpo y, por tanto, no puede predecirse en absoluto las consecuencias sobre la función anticuerpo de una acción cualquiera ejercida sobre la molécula de globulina-anticuerpo.

El modo genuino de valorar la función anticuerpo conservada en los productos de la elaboración del suero nativo es, naturalmente (dado el fin terapéutico del suero), la determinación de su capacidad neutralizante de la toxina *in vivo*. Ahora bien, esta determinación, que puede estudiarse en (2), es costosa en animales y sobre todo en tiempo, lo que prolonga extraordinariamente el curso de una investigación. Por este motivo esta valoración de la neutralización utilizando como índice los efectos de mezclas de toxina y antitoxina-problema sobre el animal vivo (*), se intenta sustituir por criterios físicos-químicos *in vitro* de tal neutralización (mucho más rápidos y económicos).

(*) Los métodos de valorar la cantidad de antitoxina en un suero por la neutralización de la toxicidad de una toxina se verifican apreciando la cantidad de suero que mezclado *in vitro* con una cantidad conocida de toxina, produce una mezcla de una determinada toxicidad (por ejemplo, mortalidad del 50 por 100 de los animales inyectados). Es evidente que esta disposición del experimento puede no reflejar con exactitud la eficacia real de un suero para curar un proceso patológico en marcha. En esta eficacia influye no sólo el poder de neutralizar la toxina una vez mezclado con ella (que es lo que meramente mide la valoración) sino otros factores que pueden jugar en su aplicación terapeútica, como son la facilidad de acceso al lugar donde está actuando y la estabilidad del anticuerpo en el organismo animal tratado.

No cabe duda que para apreciar directamente el valor terapeútico de un suero habría que evaluar su efecto sobre procesos patológicos en distinta fase de su desarrollo, desencadenados en grupos de animales del conveniente tamaño, al menos hasta demostrar que la eficacia curativa es directamente proporcional a la capacidad neutralizante *in vitro* medida *in vivo;* es decir, que son despreciables los factores antes señalados.

En comunicación aparte expondremos cuando reunamos los resultados necesarios: 1) la correlación entre poder curativo en las distintas fases y capacidad neutralizante tal como hoy suele medirse; 2) establecimiento de un método farmacológico de determinación del poder curativo (en fase precoz y en fase de máximo desarrollo reversible de la enfermedad correspondiente); y 3) examen relativo de estas correlaciones en las distintas toxinas (tetánica, diftérica, botulínica, etcétera).

En la antitoxina diftérica este intento se ha logrado apoyándose en la observación de que esta antitoxina, además de neutralizar el efecto tóxico de la toxina a la que debe su formación, precipita con ella en condiciones apropiadas (G. Ramon) (3). Ahora bien: al destruir el estado nativo de la antitoxina diftérica (¿desnaturalización, desdoblamiento?), concretamente por digestión péptica, por tanto en medio muy ácido, se dificulta la observación del punto de neutralización por floculación siguiendo la técnica de Ramón; hemos orillado esta dificultad determinando el punto de neutralización de estas toxinas y antitoxinas en medio hidroalcohólico (4). Por lo demás, la valoración de la antitoxina tetánica por floculación no ha podido lograrse hasta la fecha, debido a la aparición de floculaciones anómalas (5); y, en todo caso, hay que establecer el paralelismo riguroso entre los resultados obtenidos por la valoración *in vitro* que se elija para el trabajo experimental sistemático con los de la neutralización de los efectos de la toxina *in vivo*.

El fenómeno inicial de toda reacción antígeno-anticuerpo es el enlace de una y otra molécula por los grupos determinantes de su afinidad específica mutua; esta combinación de ambas moléculas puede traducirse de distintos modos (floculación, neutralización de alguna actividad del antígeno o del anticuerpo), ninguno de los cuales es *a priori* obligado. En la diversidad del modo de manifestarse la neutralización de los antígenos y de los anticuerpos nativos influye de modo eminente el estado físico del antígeno (ya que todos los anticuerpos, cualquiera que sea su especificidad, son siempre seroglobulinas de muy semejantes propiedades físicas y químicas—no difieren sino en su afinidad respecto al determinante del antígeno, con el que reaccionan, y quizá en el número de sus antideterminantes por moléculas—) (teoría de la unidad de los anticuerpos defendida y en gran parte impuesta gracias al esfuerzo de Doerr) (6). Ahora bien: lo anterior es solamente válido para los anticuerpos en estado nativo; al someter éstos a operaciones físico-químicas se introducen alteraciones en su estado tales que, con facilidad, puede perderse el valor que tenga el coeficiente que transforma los resultados de una valoración *in vitro* en los de una *in vivo* operando con el anticuerpo nativo. Esta posibilidad debe tenerse muy en cuenta en el curso de los trabajos de desantigenización de sueros.

Como nos desvía de nuestro tema concreto, limitamos a estas ideas generales la exposición de la valoración de la función antitóxica, valoración cuyo dominio en productos nativos y elaborados es la primera condición para llevar a cabo el trabajo que nos ocupa. Pasaremos, pues, a estudiar la valoración de la otra función, la anafiláctica, de la que deseamos desposeer al producto antitóxico.

II

VALORACION DE LA ACTIVIDAD ANAFILACTICA

I. *Dificultades de esta valoración.*

Las dificultades de esta valoración rebasan considerablemente, en nuestro sentir, las de la valoración de la función antitóxica. Vamos a exponer seguidamente algunas razones de esta dificultad.

1. *El desconocimiento de la esencia de la anafilaxia.*—Es necesario afirmar que hasta la fecha desconocemos en absoluto cuál es la causa del estado anafiláctico y del choque anafiláctico. La inmunología vigente atribuye el estado anafiláctico a anticuerpos sésiles, y el choque anafiláctico a una reacción intracelular (o adcelular) de dichos anticuerpos con el antígeno al que deben su formación. Ahora bien: no hay pruebas directas de la existencia de tales anticuerpos anclados a la célula, y se carece de toda explicación verosímil de cómo los anticuerpos llegan a hacerse sésiles con preferencia a las restantes seroglobulinas, y de cómo la presunta reacción entre el anticuerpo sésil y su antígeno se traduce en la liberación de anafilotoxina. No hay que decir que el desconocimiento de la verdadera naturaleza de la anafilaxia ha de reducir a una búsqueda meramente empírica y muy probablemente infructuosa la tentativa de valorar la intensidad del estado anafiláctico de un animal por cualquier otra manifestación que no sea el choque mismo.

2. *Desconocimiento empírico de toda variable física, química o biológica que sea función de la capacidad anafilactizante.*—La valoración de la actividad anafiláctica también se dificulta por el desconocimiento de toda característica física, química o biológica que permita predecir la energía anafilactizante de un antígeno (en nuestro caso del plasma antitóxico o de sus preparados). Es decir, no solamente se desconoce la esen-

cia del estado anafiláctico, sino que tampoco se ha podido observar empíricamente ninguna correlación entre la energía anafilactizante de un antígeno y otra propiedad suya (propiedad cuya medida podría orientarnos acerca de la energía anafilactizante). Es evidente que este estado de cosas contrasta con el de la valoración de la función antitóxica; no solamente se sabe que esta función radica en seroglobulinas inmunes, sino que el contenido de ellas en un plasma antitóxico (nativo o elaborado) puede medirse, además de por su capacidad de proteger *in vivo* frente a la toxina (medida directa o genuina de la función útil), por medidas de floculación *in vitro* con el antígeno.

3. *Imposibilidad de efectuar la valoración directamente en seres humanos y dificultad de extrapolar al hombre los resultados de valoraciones en animales.*—El actual desconocimiento de la esencia de la anafilaxia y el fracaso hasta la fecha de las tentativas de correlacionar empíricamente la energía anafilactizante de un producto con otra característica de éste apreciable *in vitro* (fracaso que en nuestra opinión se debe a que el problema carece de sentido biológico (*), nos fuerzan hoy a apreciar esta energía de este modo directo. Es decir, no poseemos actualmente otro medio de medir el poder anafilactógeno de un producto (en nuestro caso plasma antitóxico o sus derivados) más que sensibilizar con él animales y desencadenar en ellos con él choques, pasado el período conveniente de latencia. Ahora bien: la doble determinación del poder sensibilizante y del poder desencadenante resulta difícil por las razones siguientes que procuraremos exponer ordenadamente:

El planteamiento concreto del problema es el siguiente: habría que establecer: 1, cuál es la máxima dosis del preparado que puede administrarse parenteralmente a los enfermos sin que se produzca sensibilización; 2, la máxima dosis del preparado que puede administrarse parenteralmente a los enfermos sensibilizados sin que se desencadenen trastornos anafilácticos; y 3, estudiar la variabilidad de la respuesta de los enfermos a la sensibilización y al desencadenamiento para calcular los coeficientes de seguridad convenientes. Evidentemente, no podrá considerarse resuelto el problema de la desantigenización hasta que la dosis máxima terapéutica administrada del modo más sensibilizante (o, en su

(*) De hecho, la energía anafilactizante, como en general la energía antigénica, de un producto, no radica en propiedades intrínsecas de él (apreciables por un análisis in vitro) sino de la correlación entre propiedades de él y otras hasta hoy desconocidas del animal que se inmuniza (por ejemplo, en un caso extremo ninguna proteína propia en estado nativo, actúa como antígeno).

caso, desencadenante) esté por debajo de la dosis mínima sensibilizante (o desencadenante) con el margen de seguridad establecido.

No hay que decir que cuando se trata de sueros para administrar a enfermos humanos hay que excluir la utilización de individuos de la misma especie para efectuar sobre ellos la valoración. Sobre personas no cabe sino, *a posteriori*, registrar estadísticamente los resultados observados en el tratamiento de gran número de enfermos con preparados que se estimen los óptimos que pueden conseguirse. Para este propósito, que escapa a nuestros recursos de preparadores no oficiales, las autoridades sanitarias habrían de conocer exactamente y con seguridad el modo de preparación de los diversos productos para irlos contraponiendo con los resultados, y así orientar el paulatino perfeccionamiento de los preparados hasta que cumplan la norma expuesta. Pero, además, y en todo caso, esta comprobación estadística *a posteriori* no exime, naturalmente, de ningún modo del estudio experimental previo de un producto nuevo que se destine a medicina humana.

Este estudio experimental hay, pues, que efectuarlo en animales. Ahora bien, la valoración en animales del poder anafilactógeno para el hombre de un producto es un problema difícil por las razones que vamos a analizar:

En *primer lugar*, porque las distintas especies animales difieren extraordinariamente entre sí en cuanto a su susceptibilidad para la anafilaxia, sin que se conozca ninguna correlación entre el grado de susceptibilidad de las especies, por una parte, y por la otra la colocación en el sistema natural o cualquier otra característica de ellas. (Por ejemplo, el cobayo se distingue por una extraordinaria sensibilidad que permite provocar en él, sistemáticamente, choques gravísimos—en un gran porcentaje letales—con dosis increíblemente bajas de una gran proporción de proteínas extrañas), y la rata se distigue, en cambio, por una resistencia tal que requiere una sensibilización forzada con un anafilactógeno enérgico para observar en raros animales trastornos siempre benignos: no hay que señalar que ambas especies—de tamaño muy parecido—están muy próximas en el sistema natural.) Si se ordenaran las pocas especies en las que se ha estudiado con cierto detenimiento la anafilaxia (cobayo, perro, conejo, rata, gato y pocas más), no podríamos situar al hombre en la serie, ya que la ética impide estudiar experimentalmente en individuos humanos el fenómeno. Tal vez no pueda expresarse una

mayor precisión que decir que el hombre es mucho menos susceptible que el cobayo, y mucho más susceptible que la rata, a reaccionar con trastornos anafilácticos frente a la administración parenteral de proteínas extrañas.

En *segundo lugar*, la serie en que se ordenen las especies por su susceptibilidad general al choque puede alterarse con ciertos antígenos (en un caso límite, por ejemplo, una proteína de cobayo sin desnaturalizar no sensibilizaría al cobayo y sí al hombre, a pesar de que, en general, el cobayo adquiere el estado anafiláctico con mucha mayor facilidad que el hombre). Por consiguiente, cabe en lo posible que un tratamiento reduzca o exalte de un modo muy desigual para el hombre y para el cobayo la actividad anafilactógena o desencadenante de un producto (en nuestro caso de un suero).

Teniendo en cuenta las ideas generales que acabamos de exponer, pasamos a concretar las dificultades previsibles. Casi no hay otro medio de valorar la actividad anafiláctica de un producto que determinar su dosis mínima sensibilizante y su dosis mínima desencadenante en el cobayo (ya que el cobayo es, entre los raros animales estudiados en cuanto a la anafilaxia, el único que reúne las condiciones indispensables de susceptibilidad y precio accesible, teniendo en cuenta que estos experimentos exigen gran número de animales). Pero la gran facilidad con que el cobayo adquiere el estado anafiláctico (que hace de él un animal de selección para estudiar científicamente la anafilaxia) supone un grave inconveniente para ensayar en él productos destinados al hombre, mucho menos anafilactizable. Con el cobayo, con seguridad, darán choques letales productos inocuos para el hombre. El examen farmacológico en tales animales haría desechar productos aplicables en terapéutica humana que poseen el margen de seguridad necesario.

II. *Unico método de que hoy puede disponerse para valorar la actividad anafiláctica de preparados destinados al hombre.*

1. *Aplicación de productos testigo de naturaleza análoga y de un grado conocido y conveniente de actividad anafiláctica sobre el hombre.*—Hemos visto que la única posibilidad actual de valorar la actividad anafiláctica de un producto es la medida directa de sus efectos anafilácticos en animales; concretamente, puede decirse que hoy el cobayo es

la única especie indicada para este fin. El problema inmediato es, pues, cómo inducir de la actividad anafiláctica de un producto sobre el cobayo cual sea la actividad del mismo producto sobre el hombre.

La única posibilidad que vemos de cumplir este propósito es el comparar los efectos anafilácticos sobre el cobayo del producto problema y de otro u otros productos de cuya actividad anafiláctica sobre el hombre haya experiencia. Si el tema de una investigación en curso consiste (como en nuestro caso) en eliminar en lo posible la actividad anafiláctica de un producto (sueros antitóxicos terapéuticos) sometiéndolo a diversos agentes, habrá que comparar la actividad de cada uno de los preparados que se vayan obteniendo con la de un producto—o productos—que cumplan estas tres condiciones: *primero,* tener una actividad anafiláctica sobre el hombre precisada por una suficiente experiencia clínica; *segundo,* que esta experiencia haya demostrado que sus efectos anafilácticos sobre el hombre no alcanzan a apreciarse o son prácticamente tolerables; y *tercero,* que sean de la misma naturaleza química (tengan la misma procedencia biológica), y, si es posible, que hayan sido obtenidos por un método análogo al empleado para preparar el producto problema. Si este último producto manifiesta una actividad anafiláctica sobre el cobayo igual o menor que la de tales productos testigo, puede admitirse que ofrece la garantía necesaria para ser aplicado al hombre.

Veamos, por ejemplo, cómo elegir los productos testigo en el problema objeto de esta comunicación (la privación del carácter de anafilactógeno de los sueros antitóxicos). Ni que decir tiene que tales productos testigo habrán de ser: preparados de sueros antitóxicos procedentes de la misma especie animal, desantigenizados por un método análogo al seguido para obtener el preparado problema (para garantizar en lo posible que la relación de actividades observada en el cobayo será igual en el hombre), y cuya inocuidad para el hombre esté asegurada por una experiencia clínica suficiente. Consideramos aconsejable, una vez elegido uno de estos preparados testigo, distribuirlo en pequeñas porciones alícuotas bien medidas y conservarlas liofilizadas, para obtener resultados comparables a lo largo de una investigación prolongada.

2. *Determinación de la actividad sobre el cobayo, tanto del producto problema como del producto testigo.*—Como es bien sabido, el estado de anafilaxia se crea en un animal por la administración parenteral de un antígeno (inyección sensibilizante); el estado se descubre únicamente en

que, pasado el tiempo necesario para su creación, que suele ser unas tres semanas, el animal responde con choque anafiláctico (un síndrome constante para cada especie animal, cualquiera que sea el antígeno) a una nueva inyección del mismo antígeno o de un antígeno análogo (inyección desencadenante).

Por consiguiente, el conocimiento de la actividad anafiláctica de un producto necesita tres determinaciones: *a)* la determinación de su poder sensibilizante (esto es, de su capacidad de originar un estado de anafilaxia para él mismo en animales normales); *b)* la determinación de su poder desencadenante (esto es, la de desencadenar el choque anafiláctico en animales previamente sensibilizados por él); y *c)* la determinación de sus relaciones de especificidad anafiláctica con productos análogos (esto es, el estudio de su capacidad de sensibilizar para los antígenos análogos que interesan y de su capacidad de desencadenar el choque anafiláctico en animales sensibilizados por estos antígenos análogos). Pasemos, pues, a estudiar la práctica de estas tres determinaciones, relativas a la capacidad anafiláctica de un producto, en cobayos.

a) *Determinacin del poder sensibilizante.*—En nuestra opinión, la determinación del poder sensibilizante puede requerir efectuar varias valoraciones distintas: siempre habrá que medir la capacidad de sensibilizar usando como desencadenante el mismo producto problema; esta capacidad podrá expresarse por la dosis que, administrada por vía subcutánea (en la zona peritoneal), sensibiliza a los cobayos con intensidad tal, que al administrarles a los veinte días en el torrente circulatorio una dosis desencadenante óptima del mismo producto, desencadena un choque anafiláctico letal en el 50 por 100 de los animales; en general, usamos grupos de seis cobayos para cada dosis sensibilizante del producto.

Ahora bien: en nuestro caso concreto, en que en último término perseguimos la desantigenización de un producto de aplicación terapéutica, esta medida de la capacidad sensibilizante puede resultar insuficiente e incluso errónea.

> Para admitir este aserto basta recordar que las capacidades de sensibilizar y de desencadenar difieren entre sí en dos respectos: *por una parte*, si consideramos una sola molécula de antígeno, evidentemente ella pierde antes (más fácilmente) la capacidad sensibilizante que la desencadenante (*); así, pues, en todo producto que

(*) En efecto, es frecuente la existencia de moléculas que poseen poder des-

se haya sometido a desantigenización (y dado, además, que toda molécula sensibilizante, por el hecho de serlo, es también desencadenante) el número de moléculas sensibilizantes es menor que el de desencadenantes. Ahora bien: *por la otra parte*, el número de moléculas antigénicas necesario para sensibilizar es mucho menor que el necesario para desencadenar. A la vista de estas dos propiedades podemos admitir que si sometemos un producto a desantigenización, irá bajando paulatinamente tanto la capacidad sensibilizante como la desencadenante de la especificidad original, pero sin poder conocer sin previo estudio experimental cuál es, en cada caso, la que desaparece antes. En efecto, cuando el agente sea tal que tenga tendencia a destruir, en todas las moléculas que ataque, ambas funciones (de modo que el producto sometido al agente contenga moléculas totalmente sin atacar—por tanto, en posesión de ambas funciones—y un número creciente de moléculas atacadas de modo tal que hayan perdido ambas funciones, pero un número relativamente escaso de haptenos), hará que el producto pierda antes la capacidad desencadenante que la sensibilizante (ya que las moléculas que hayan perdido las dos funciones predominarán con respecto a las que hayan perdido sólo una o a las que conserven ambas, y el volumen óptimo exigido para desencadenar conservará aún notoria capacidad sensibilizante cuando ya no contenga la dosis mínima desencadenante); por el contrario, cuando el agente tienda a ejercer una acción relativamente suave sobre un gran número de moléculas, aumentará relativamente el número de moléculas que sólo desencadenan con respecto a las que han perdido las dos funciones, y el producto puede desencadenar cuando ya no sensibiliza—actuar en su conjunto como hapteno—. Volviendo al aserto del párrafo anterior, vemos que si sensibilizamos con uno de estos productos sometidos a desantigenización y luego desencadenamos con él, el re-

encadenante y no sensibilizante (se incluyen bajo la designación general de haptenos); la cualidad inversa no es concebible, pues la sensibilización siempre se verifica de modo específico, es decir, con respecto a grupos que necesariamente posee la molécula sensibilizante, y por tanto ésta siempre posee poder desencadenante.

De acuerdo con lo anterior, recordemos que la capacidad de sensibilizar está vinculada en la posesión por la molécula antigénica de grandes porciones de índole proteica y en estado no muy alterado respecto al nativo; en cambio, la capacidad desencadenante radica en un grupo o estructura química concreta (de índole proteica o no proteica) que se denomina determinante de la especificidad del antígeno.

sultado negativo resulta indeterminado en cuando a que no precisa si se debe a que el producto ha perdido la capacidad sensibilizante, o la desencadenante, o ambas.

Para ponernos a cubierto de la posibilidad de que el producto haya perdido la capacidad desencadenante y conserve aún la sensibilizante, conviene repetir la prueba modificándola sólo en que se desencadena con la dosis desencadenante óptima del producto sin tratar. Esta medida (comparada con la dosis sensibilizante del producto sin tratar que prepara los cobayos con una intensidad tal que mueren el 50 por 100 al desencadenar con este mismo producto) nos da la pérdida de la capacidad de sensibilizar con respecto a *la especificidad del producto nativo* y complementa eficazmente la valoración anterior.

b) *Determinación del poder desencadenante.*—También esta determinación puede requerir varias valoraciones distintas. Ante todo, siempre habrá que medir la capacidad de desencadenar en animales sensibilizados por el producto problema; esta capacidad puede expresarse por la dosis que, administrada en torrente circulatorio, desencadena choque anafiláctico mortal en el 50 por 100 de cobayos sensibilizados veinte días antes con una dosis sensibilizante óptima del mismo producto.

Por las razones dadas en la página anterior, la determinación así efectuada de la capacidad desencadenante puede ser errónea. En efecto, cuando haya que estudiar (como en nuestro caso) la actividad anafiláctica de productos previamente sometidos a un proceso de desantigenización, pueden haber perdido en él la capacidad sensibilizante y, en cambio, conservar la desencadenante, que no podrá ponerse de manifiesto por no estar los animales convenientemente sensibilizados. Por esta razón, la valoración anterior debe complementarse repitiendo la prueba del mismo modo, pero en cobayos sensibilizados con la dosis sensibilizante óptima del producto sin tratar. Esta medida (comparada con la dosis desencadenante del producto sin tratar que mata el 50 por 100 de los cobayos sensibilizados con una dosis sensibilizante óptima de este mismo producto) nos da la pérdida de la capacidad desencadenante con respecto a la especificidad del producto nativo y complementa eficazmente la valoración anterior.

c) *Determinación de sus relaciones de especificidad anafiláctica con productos análogos.*—Al aplicar un suero puede producirse un choque por una sensibilización antigua, ya que no puede precisarse un límite máximo para la duración del estado anafiláctico en el hombre. La anamnesis se

dificulta aún más por dos circunstancias: 1) porque la sensibilización puede haberse producido no sólo por el suero en cuestión, sino por sueros de otras indicaciones terapéuticas, de la misma procedencia animal, o incluso de otro origen; y 2) porque el método de preparación de todos estos sueros puede ir variando con el transcurso del tiempo y cada uno de estos métodos de purificación (cuyo propósito es eliminar la actividad anafiláctica sin perder la actividad antitóxica), a la vez que destruye en mayor o menos grado tal actividad dentro de la especificidad propia del producto natural de partida (por ejemplo, suero equino nativo)—como efecto secundario imposible de evitar—puede introducir, en mayor o menor grado, una actividad anafiláctica de especificidad nueva inducida por el tratamiento mismo. Hemos, pues, de considerar las valoraciones a que obliga la posible interferencia (en el pasado y en el futuro de los pacientes que reciben un suero antitóxico) de dos tipos de sueros: *primero,* sueros nativos—o con restos de especificidad nativa—de distinta indicación terapéutica, sean o no de la misma procedencia animal, y *segundo,* sueros con especificidad inducida artificialmente en la purificación.

Comencemos analizando la *interferencia de otros sueros nativos o con restos de especificidad nativa.* Ante todo, lo esencial es la procedencia animal del suero y no su indicación terapéutica; en efecto, la inmunización del animal dador de suero no altera sensiblemente la especificidad natural de su suero, ya que las globulinas-anticuerpo no difieren, en cuanto antígenos, de las normales; en consecuencia, bastará contrastar la relación anafiláctica entre el suero antitóxico en estudio y el suero normal de la especie para afirmar que los resultados obtenidos son también válidos para cualquier suero nativo obtenido por inmunización de animales de la misma especie, sea cual fuere su indicación terapéutica. Por tanto, las valoraciones descritas en *a)* y *b)* nos miden el grado de interferencia posible, con el suero valorado, de todo tipo de sueros nativos de su misma procencia animal.

¿Qué decir, ahora, de la sensibilización, para un suero, producida por sueros nativos de otra procedencia animal? No cabe duda que la sensibilización producida en el hombre por la administración de suero de una especie determinada (por ejemplo, equina) se descubrirá con máxima violencia al desencadenar con el suero de la misma especie (equina); por consiguiente, los ensayos prescritos en *a)* y *b)* también protegen analíticamente de una ocasional sensibilización al suero equino provocada

por sueros de otra procedencia. Ahora bien: la posibilidad existe, y tal vez el clínico, antes de administrar un suero equino antitóxico, deba ponerse a cubierto de la posible sensibilización del enfermo por sueros no equinos (sobre todo si se han administrado hace un tiempo óptimo y en gran cantidad). Como guía del clínico puede aducirse la siguiente regla: en experimentos efectuados en una especie A, el suero de otra especie B muestra parentesco inmunológico con los sueros de un conjunto de especies próximas a ella en el sistema natural de los animales, y este conjunto tiene un radio tanto mayor cuanto más separados estén en dicho sistema natural las especies A y B (*).

Por ejemplo, si se administra a un hombre un suero de caballo, quedará sensibilizado (además de al suero de caballo) casi con seguridad al de asno, animal que pertenece al mismo género que el caballo, y cuyos sueros es difícil distinguir entre sí, sino por inmunización cruzada; es también muy posible que acuse sensibilización, si bien más débil, al suero de vaca, ya que la familia de los bóvidos pertenece al mismo orden (ungulados) que la de los équidos, y el hombre a un orden distinto (primates), dentro de la misma clase, mamíferos; en cambio, es poco probable que dicho hombre esté sensibilizado al suero de cobayo o al de perro, animales que pertenecen a órdenes distintos (roedores y carnívoros, respectivamente) dentro de la clase dicha, mamíferos; y mucho menos estará sensibilizado a los sueros de un ave, de un reptil, etc., animales que pertenecen ya a clases distintas de la de los mamíferos, que comprende tanto a la especie dadora del suero sensibilizador (caballo) como a la especie receptora (hombre). En resumen, si se administra parenteralmente a un hombre suero de un mamífero perteneciente a un or-

(*) Ni que decir tiene que la gravedad de los fenómenos anafilácticos es sumamente acusada en los individuos alérgicos. Hay que considerar, ante todo, la posibilidad de que un individuo con esta idiosincrasia esté sensibilizado frente al suero de la especie dadora del suero curativo y que por tanto pueda reaccionar ante él con trastornos de violencia anormal; pero también hay que tener en cuenta que los individuos con predisposición alérgica aunque no estén sensibilizados previamente al suero en cuestión, pueden sensibilizarse con especial facilidad y, o bien quedar en disposición de reaccionar con trastornos graves a una segunda inyección o, incluso, reaccionar ya a la primera con acusados trastornos primarios. Siempre, pues, es obligado examinar previamente la reactividad, frente al suero, de un supuesto alérgico al que haya de administrarse éste.

La intolerancia de los alérgicos frente a estos sueros, junto con el carácter de indicación forzosa que estos suelen tener, señalan la importancia terapeútica de la desantigenización de los sueros.

den distinto, cabe esperar que dicho hombre, además de al suero de la especie, quede sensibilizado en grado mayor o menor a especies pertenecientes al mismo orden de la especie dadora de suero sensibilizador; de todos los animales del orden cabe temer que desencadenen fenómenos anafilácticos (con intensidad decreciente al alejarse, en la subdivisión del orden, de la especie sensibilizadora), pero el peligro no rebasará los límites del orden.

En cambio, si sensibilizamos a un hombre con suero de un mamífero más próximo a él que el caballo, esto es, con suero de un animal perteneciente a su mismo orden de primates, la sospecha de sensibilización no alcanzará a los sueros de todos los primates, sino que quedará circunscrita a un sector del orden, que será de una categoría taxonómica tanto menor cuanto más próximo esté el primate dador del suero sensibilizador al *Homo sapiens* en el sistema natural.

Por el contrario, si el animal dador del suero con que se sensibiliza un hombre está más alejado de su especie que el caballo, por ejemplo, si es un ave, clase ésta distinta de la de los mamíferos, la posibilidad de desencadenar fenómenos anafilácticos puede extenderse a todos los órdenes de la clase aves; teniendo, pues, un ambito potencial de peligro máyor que con el caballo, en cuyo caso, como vimos, se limita a un orden.

Una vez considerada la interferencia posible que puedan tener otros sueros nativos con el suero antitóxico cuya antigüedad se estudia, nos resta por examinar las valoraciones a que obliga la posible *interferencia con sueros con especificidad inducida artificialmente.*

Para plantear convenientemente este problema hay que tener en cuenta el fenómeno de inmunidad conocido como *especificidad inducida químicamente*. Este fenómeno, en sus aspectos que nos atañen, puede resumirse así:

Si una proteína antigénica se somete a un tratamiento químico (nitración, yodación, diazotación, etc.), el producto resultante ofrece una nueva especificidad, que puede coexistir con la nativa o suplantarla más o menos totalmente. En ocasiones, si proteínas que no ofrecen entre sí parentesco inmunológico se someten, todas, a uno de tales tratamientos, los productos resultantes muestran reaccio-

nes de inmunidad cruzada: es decir, adquieren una especificidad común que se suma o que suplanta en todas ellas a las respectivas especificidades nativas, de modo que los anticuerpos obtenidos con uno de estos productos reaccionan con los restantes productos, y que, análogamente, los animales sensibilizados por uno de ellos reaccionan con fenómenos anafilácticos a la inyección desencadenante de cualquiera de los otros.

La especificidad creada por estos tratamientos es, en ocasiones, muy estricta; y así, por vía serológica o por ensayos de anafilaxia en cobayos, pueden diferenciarse entre sí los productos resultantes de someter a distintos tratamientos una misma proteína. La especificidad inducida (el determinante inmunológico), en unos casos parece ajustarse estrictamente al radical no proteico que se haya incorporado a la proteína en el tratamiento de la misma (en tal caso el radical aislado se comporta como hapteno); en otros, más frecuentes, la especificidad radica en una parte mayor o menor de la estructura proteica alterada por el tratamiento.

Por último, interesa puntualizar, en este inciso acerca de la especificidad inmunoquímica, un extremo interesante: creemos bien fundada nuestra opinión de que la capacidad de producir anticuerpos (o la de crear el estado de anafilaxia) propia del antígeno «completo» requiere dos condiciones sucesivas, y, en cierto sentido, antitéticas. *Primera condición.* Ante todo la actividad antigénica exige la capacidad del antígeno de integrarse en una célula del animal inmunizado cuyo citoplasma ofrezca convenientes condiciones de homología con el citoplasma de que procede el antígeno; en último término, depende de las analogías de estructura formal entre el antígeno y dicho citoplasma (esta condición primera explica que la actividad antigénica esté circunscrita predominantemente a las proteínas en cuanto que ellas son los constituyentes esenciales de todo citoplasma); si concebimos el citoplasma celular como una estructura coherente por cuyo ámbito se propagan continuamente las alteraciones cuyo proceso es la vida, hemos de entender que la integración del antígeno en el citoplasma «huésped» significa que trasciende algunas de sus propias estructuras formales por el citoplasma dicho; esta propagación de estructuras del antígeno por el citoplasma homólogo constituye la primera condición para pro-

ducir anticuerpos (o para crear el estado anafiláctico), y, como hemos dicho, exige una analogía entre la estructura del antígeno y la del citoplasma de la célula sede del proceso primario de la inmunización. *Segunda condición.* Ahora bien: el antígeno comparte la condición anterior con los trozos del citoplasma propio que constantemente se desintegran y se integran en la estructura del citoplasma de toda célula (*); dado que, evidentemente, esta perpetua integración en todas las células del organismo de material propio no se refleja en trastornos o manifestaciones inmunitarios, hemos de admitir que la primera condición es necesaria, pero no suficiente, para que una sustancia actúe como antígeno; para que esto se verifique es necesario, además, que la integración trastorne el citoplasma, esto es, que exista en el antígeno alguna estructura que, por una parte, sea capaz de conformar hacia sí las porciones homólogas del citoplasma huésped, y que, por otra parte, sea lo bastante distinta de la forma normal de estas porciones homólogas como para que, cuando (después de conformadas al antígeno) caigan aisladas en disolución en el medio hídrico citoplásmico, no puedan integrarse nuevamente en el citoplasma; estas estructuras aisladas son, pues, *los caracteres diferenciales entre la proteína ajena y el citoplasma homólogo propio que, no obstante son capaces de trascender* (**); en una palabra: son los determinantes inmunológicos del antígeno.

(*) Es decir, la integración del antígeno en la célula que posee un citoplasma homólogo y la subsiguiente selección y segregación de los determinantes inmunológicos en dicho citoplasma (a que nos lleva nuestra interpretación de la inmunidad), obligan a considerar este fenómeno, como un aspecto del funcionamiento normal del citoplasma. Esta conclusión de la teoría de la inmunidad expuesta en (7), se ha visto confirmada de modo plenamente satisfactorio por las conclusiones a que lleva el examen de la estructura del citoplasma por medios físicos y fisicoquímicos indirectos (examen por rayos X, medidas de viscosidad, caídas de graves a través del citoplasma, medidas ópticas, etc.) y directos (examen en el microscopio electrónico) que se estudian magistralmente en el libro de Frey-Wysling, *Submicroscopic Morphology of Protoplasm* (8), cuya versión española acaba de aparecer (9).

Según este examen el citoplasma es una armazón reticular de la que constantemente se desprenden fragmentos y a la que, constantemente, se reintegran otros. Esta notable manifestación del dinamismo íntimo del citoplasma viviente, no sólo concuerda con la interpretación de la inmunidad basada en la idea de que el antígeno completo comienza por interferir en el funcionamiento normal del citoplasma homólogo, sino que ayuda a interpretar este funcionamiento mismo del citoplasma normal.

(**) A este respecto puede consultarse el capítulo del libro *Inmunidad y automultiplicación proteica*. El grupo de pruebas mejor sistematizado con seguridad, es el que nos brinda el análisis de las características de los determinantes inmu-

Evidentemente, los efectos antigénicos de la administración parenteral de una proteína han de ser consecuencia del grado en que se cumplan las dos condiciones (condiciones que, sin duda alguna, no son absolutas de la proteína, sino que se refieren, ambas, a correlaciones existentes entre proteína ajena y citoplasma celular huésped). Por otra parte, en general, sin maduro examen, no puede decirse en qué proporción un determinado efecto inmunitario se deba al grado en que se cumplen una y otra condición. (Por ejemplo, en un caso extremo una proteína puede carecer de todo efecto antigénico y deberse a dos causas totalmente opuestas: a cumplir perfectamente la primera condición y no cumplir en absoluto la segunda—caso de las proteínas propias o el de las proteínas simples y poco diferenciadas—, o a no cumplir la condición primera—caso de una proteína que por su procedencia o por haber sufrido una desnaturalización profunda no encuentra en el animal que la recibe ningún tipo de célula cuyo citoplasma ofrezca las condiciones de analogía necesarias para que se integre en él.)

Así se explica el hecho—sin interpretación en la inmunología clásica—de que las proteínas propias de la especie del animal inmunizado o algunas proteínas sencillas, como globinas o histonas, que en estado nativo no son antigénicas, adquieran la capacidad de producir anticuerpos o de originar el estado anafiláctico si se desnaturalizan moderadamente por medios físicos o químicos. Estas proteínas en estado nativo poseen en su grado máximo la capacidad de integrarse en el citoplasma homólogo y de propagar por él sus estructuras; ahora bien: el fenómeno no se refleja en trastornos inmunitarios (específicos e inespecíficos) debido a que no existen caracteres diferenciales entre las estructuras de unas y otras proteínas y los correspondientes citoplasmas homólogos; basta crear estos caracteres diferenciales para que dicha integración se pueda descubrir en la formación de anticuerpos o en la creación del estado de anafilaxia.

En resumen: ¿qué efecto cabe esperar sobre la antigenicidad de una proteína de la acción de un agente físico o químico? No cabe duda de que la *primera condición* de la antigenicidad (la similitud

nológicos de las proteínas de vertebrados; estas pruebas las ha expuesto uno de nosotros en dos recientes conferencias (10) y serán objeto de una próxima comunicación.

de sus estructuras con las del citoplasma homólogo) siempre se reducirá (*); puede, pues, preverse con gran verosimilitud que al avanzar un proceso cualquiera de desnaturalización *in vitro* de una proteína habrá de perderse para la multiplicación antigénica un tanto por ciento cada vez más alto de moléculas del antígeno (es decir, una fracción cada vez más alta no conseguirá integrarse ya en el citoplasma homólogo), y a la vez, de cada molécula que se conserve hábil para la función antigénica se integrará en el citoplasma homólogo viviente una porción por término medio más reducida. No tan claramente previsibles son las consecuencia de la desnaturalización sobre la *segunda condición* que ha de tener la molécula antigénica, es decir, sobre las estructuras diferenciales entre antígeno y citoplasma homólogo. A primera vista (y por razones análogas a las expuestas en la nota anterior al pie de página) podría pensarse que el número de tales estructuras diferenciales —sumamente especiales, ya que han de ser distintas, pero a la vez muy afines a las propias homólogas, para que éstas se conformen a ellas—habría de disminuir también en la desnaturalización; y esto parece admisible, en general, refiriéndonos a los determinantes preexistentes (esto es, la desnaturalización irá haciendo perder—como efectivamente se observa—la especificidad propia del producto nativo). Pero hay que tener en cuenta la posibilidad de que se creen determinantes artificiales en cantidad que compense con creces a los naturales perdidos. La discusión de este importante punto merece párrafo aparte.

A primera vista parece inverosímil que puedan crearse estos sutiles caracteres diferenciales por una acción física o química que, necesariamente, ha de ser drástica, y, en todo caso, que, *in vitro*, no puede conducirse artificialmente de modo que convenga con las estructuras de antígeno y homólogo (estructuras de las que se desconoce el fundamento químico de la especificidad). De hecho, dentro de la interpretación vigente, al llegar a este punto se tropieza con una barrera infranqueable entre las características de la inmunidad por antígenos en estado nativo y las de la inmunidad por antí-

(*) Dado el desconocimiento absoluto en que estamos actualmente de cuales sean las estructuras peculiares que distinguen unas proteínas de otras y su indudable delicadeza es, naturalmente, imposible que por una acción física o química *in vitro* una proteína llegue a asemejarse más, de modo fortuito, a otra análoga.

genos con especificidad inducida químicamente. Al parecer, repetimos, está bien fundamentada la aseveración de que los determinantes inmunológicos de las proteínas de vertebrados son las estructuras de estas proteínas que constituyen primeras diferencias entre ellas y las proteínas propias homólogas; en una primera impresión pudiera parecer difícil aceptar que la acción—necesariamente desorganizadora e imposible de conocer—que un agente físico o químico cualquiera pueda ejercer *in vitro* sobre una proteína consiga crear en ésta unas nuevas sutiles primeras diferencias precisamente entre ella y la proteína propia homóloga. Ahora bien: opinamos que, bajo el supuesto de la multiplicación antigénica, ambos grupos de hechos concuerdan perfectamente sin necesidad de hipótesis auxiliares. Pasemos, pues, a ver cómo, bajo esta interpretación, los determinantes artificiales se crean por un cauce biológico previsible dentro de la teoría general, lo que los unifica con los determinantes naturales.

La acción directa *in vitro* de un agente químico o físico sobre una molécula proteica se entiende que sólo puede causar efectos de los tres tipos siguientes: 1) sobre los puntos de la estructura molecular donde actúe más drásticamente ejercerá una acción tal que la porción así afectada se desvinculará del campo estructural del resto de la molécula proteica; 2) sobre otros puntos (sobre los que, en general, el agente actuará de modo mediato a través de los puntos anteriores) ejercerá una acción tal que sufrirán un trastorno que no conseguirá desvincularlos del campo estructural del resto de la molécula, pero que será irreversible por el campo estructural inafectado restante (estos puntos, pues, conservarán una dinamia influída por el resto de la molécula, y, a su vez, influirán sobre la dinamia de este resto, pero—como efecto de su alteración irreversible—constituirán centros de un orden formal más o menos distinto del ordinario de la molécula, sin serlo tanto que rompan la coherencia espaciotemporal de ella); 3) sobre otros puntos la alteración será o nula o intrascendente. En nuestro sentir, si concebimos la molécula proteica como un conjunto estructural cuyas diversas partes mantienen una armonía de forma y de acontecer, resulta muy verosímil que numerosas acciones hayan de ejercer simultáneamente los tres efectos. El considerar la molécula como una es-

tructura supone admitir que constituye un campo de transmisión de alteraciones; de no serlo, se producirán exclusivamente alteraciones de tipo 1 y de tipo 3. Así, pues, siempre que una proteína sufra *in vitro* una acción ni tan enérgica que la destruya totalmente en cuanto a campo estructural proteico, ni tan suave que no la afecte nada en cuanto tal, se crearán en ella zonas que han experimentado trastornos del tipo 2. Ahora bien: ni que decir tiene que estas zonas dotan a la molécula de una antigenicidad potencial; en efecto, el hecho mismo de que la alteración trascienda sus efectos sobre el resto de la molécula tratada *in vitro*, explica que pueda trascenderlos también por el citoplasma homólogo en que se integre al ser ella utilizada como antígeno. Vemos, pues, que la especificidad antigénica que provoca un agente físico o químico *in vitro* está condicionada por la molécula proteica misma que sufre el efecto del agente. De no tenerse esto en cuenta, la inmunización por antígenos artificiales podría dar una impresión exagerada de la plasticidad proteica; en la interpretación dada se reduce a los mismos límites biológicos de la inmunización con antígenos naturales. Cuando la integración del agente produzca en la proteína una alteración tan suave que la zona directamente afectada no sufra sino una alteración del tipo 2, el agente químico mismo puede funcionar como hapteno; en otro caso, más general, lo que determine la afinidad inmunoquímica será una estructura de la proteína sometida al agente, estructura que ha experimentado una alteración del tipo 2 por efecto de dicho agente (precisamente por la índole estructural de la proteína capaz de establecer un campo de alteración formal).

Una vez expuesta nuestra interpretación teórica de la especificidad inmunológica inducida químicamente, pasemos a las consecuencias prácticas que esta especificidad tiene para nuestro tema. Como hemos dicho, los hechos son: una proteína sometida a un agente físico o químico, a la vez que pierde, en mayor o menor grado, la especificidad natural, adquiere una especificidad nueva, y esta especificidad suele emparentar inmunológicamente a la proteína así tratada con otras sometidas al mismo tratamiento—aunque en estado nativo no presentarán con aquélla ninguna similitud inmunológica—. Por consiguiente, al administrar parenteralmente un suero sometido a un cierto tratamiento físico o químico, cabe

temer una interferencia anafiláctica con sueros de una procedencia cualquiera—incluso con proteínas cualesquiera—que hayan sido sometidos a un tratamiento análogo. En consecuencia, aunque evidentemente será regla general que un suero desespeciado sensibilice con máxima intensidad para sí mismo y, recíprocamente, que desencadene con máxima intensidad en individuos sensibilizados por él, cabe la posibilidad de una interferencia anafiláctica con otros sueros (o, en general, con otras proteínas) que, por su tratamiento, hayan adquirido la misma especificidad inmunoquímica.

En efecto, téngase en cuenta que el tratamiento comenzará creando la nueva especificidad que luego él mismo irá destruyendo en mayor o menos grado. Como se expuso para la especificidad nativa, esta destrucción (aunque se efectúe por un mismo agente) puede destruir (según el modo de aplicarlo) preferentemente la función sensibilizante o la desencadenante. Es decir, dos tratamientos con un mismo agente pueden crear la misma especificidad y destruir en un producto la función sensibilizante y en el otro la desencadenante. No cabe duda de que en este caso previsible las reacciones obtenidas sensibilizando con el segundo y desencadenando con el primero darán trastornos anafilácticos más intensos que al repetir las inyecciones de uno o del otro.

Por tanto, parece aconsejable, al lanzar al mercado un nuevo suero, estudiar antes sus relaciones anafilacticas con los otros sueros obtenidos por un tratamiento análogo que estén en uso en el mercado. (Tal vez convenga para este fin hacer obligatorio el consignar fidedignamente los agentes empleados para desantigenizar los fármacos destinados a administración parenteral.) Ya que, según lo expuesto, un suero puede resultar mejor o peor según los antecedentes de los tratamientos serológicos de la población a que se dirige.

Para terminar este apartado deseamos discutir las ventajas de privar a un suero del poder sensibilizante o desencadenante. No cabe duda de que teóricamente lo preferible sería privar al suero de ambos poderes; ahora bien: el hacerlo de modo absoluto puede resultar tan difícil que no sea viable sin destruir gran parte del poder antitóxico. Cabe la posibilidad teórica de que el tratamiento por un mismo agente físico o químico, según como se verifique la operación, tienda a destruir preferentemente una u otra función (extremo que se ha indicado en un trabajo anterior (1) y que se estudiará con más detenimiento en uno próximo);

cabe, pues, preguntarse qué convenga más: si esforzarse en destruir el poder sensibilizante o el desencadenante de un suero. En nuestra opinión, no puede darse una respuesta general; la dirección del esfuerzo debe depender no sólo de las características de nuestro suero, sino de las de los otros con él relacionados inmunológicamente que existan en el mercado. Por ejemplo, no cabe duda de que para administrar suero por vez primera a un niño, o cuando se trate de introducir en la clínica un suero de una procedencia animal distinta de la de los sueros habituales, o en el caso de un suero obtenido por un tratamiento nuevo que le confiera una especificidad química sin precedente, está indicado buscar con preferencia sueros sin poder sensibilizante. En cambio, cuando se tema que el individuo o la población puedan estar más o menos sensibilizados según la especificidad del suero, interesa que éste carezca en lo posible de poder desencadenante, condición que con más motivo ha de cumplir en lo posible si ha de ser administrado a posibles alérgicos.

CUADRO RESUMEN DE LAS VALORACIONES PARA PRECISAR EL PODER ANAFILACTOGENO DE UN SUERO (EN COBAYOS)

Ensayo núm.	INYECCIÓN SENSIBILIZANTE			INYECCIÓN DESENCADENANTE			Dosis letal 50
	Producto	Dosis		Producto	Dosis		
		Optima	Variable		Optima	Variable	
1	Suero en estudio		+	Suero en estudio	+		
2	Suero testigo		+	Suero testigo	+		
3	Suero en estudio		+	Suero nativo	+		
4	Suero testigo		+	Suero nativo	+		
5	Suero en estudio	+		Suero en estudio		+	
6	Suero testigo	+		Suero testigo		+	
7	Suero nativo	+		Suero en estudio		+	
8	Suero nativo	+		Suero testigo		+	

NOTA.—Interesa completar el cuadro de valoraciones repitiendo los ensayos 3, 4, 7 y 8, sustituyendo en ellos el suero nativo por un suero de mucho uso y obtenido por un procedimiento de desespeciación análogo. Esta repetición se efectuará con cuantos sueros aconseje la prudencia a la vista de los resultados que se vayan observando.

Los ensayos 1 a 4 permiten comparar el poder sensibilizante del suero en estudio con el de suero testigo (éste ha de ser el suero existente en el mercado que se considere que ofrece las máximas garantías de despeciación). Los ensayos 5 a 8 permiten comparar el poder desencadenante del suero problema con el del mismo suero testigo.

Cada ensayo se verifica como se señala en el texto.

III. *Direcciones de investigación para perfeccionar la valoración de la función anafiláctica.*

En el apartado II se ha expuesto el único método de que, en nuestra opinión, hoy se dispone para poder enjuiciar con conocimiento de causa la actividad anafiláctica frente al hombre de un producto. Este método tiene dos inconvenientes obvios: el *primero*, que no valora directamente el efecto anafilactizante del producto en el organismo a que se destina (el humano), y el *segundo*, que exige gran gasto de cobayos, pero, sobre todo, que cada determinación dura unas tres semanas, tiempo requerido para que los animales puedan sensibilizarse. Este inconveniente resulta tolerable para examinar sistemáticamente el poder anafiláctico de los lotes de un producto destinados al uso clínico, pero condena a una desesperante lentitud la investigación en busca de nuevos métodos de obtención de productos más perfectos. Ni que decir tiene que una valoración inobjetable del poder anafilactizante de un producto habrá de permitir: *a)* apreciar sin riesgo dicho poder directamente en el hombre; y *b)* verificarse en animales de modo inmediato, es decir, sin necesidad de que transcurra el período de sensibilización.

Es claro que para lograr este objetivo ideal hay que emprender investigaciones que nos acerquen a la comprensión de cuál es la esencia del estado anafiláctico y del choque anafiláctico. Es indudable que la inyección sensibilizante entroniza de modo inmediato una modificación en el organismo que la recibe, puesto que éste, sin más influencia ulterior externa, aboca necesariamente al estado de sensibilidad; si se conociera de modo profundo cómo se inicia el proceso que culmina en el estado anafiláctico, podría también resultar posible conocer inmediatamente después de administrado un producto si éste ejerce la acción desconocida que culminará en que el animal quede sensibilizado a dicho producto.

A nuestro modo de ver ofrece una posibilidad teórica el estudio comparado entre los *trastornos generales inespecíficos vinculados a la antigenicidad* y el *choque anafiláctico*. Denominamos trastornos generales inespecíficos vinculados a la antigenicidad los que el organismo animal experimenta como consecuencia de la administración *primera* de muchos antígenos—tal vez de todos en mayor o menor grado—; no cabe duda

de que, paralelamente, el choque anafiláctico puede definirse como los trastornos generales inespecíficos vinculados a una *segunda* inyección de un antígeno (después de transcurrido el período de sensibilización). Nos parece muy probable que para que un animal quede en estado de sufrir los segundos trastornos por la segunda inyección antigénica haya de haber sufrido necesariamente alguno de los primeros y que quepa establecer una relación de proporcionalidad fidedigna entre la intensidad de unos y de otros. De ser ello así, la determinación cuantitativa de los primeros podría utilizarse como norma analítica para seguir con rapidez los estudios de investigación relativos a la desespeciación de productos; es decir, permitiría conocer de inmediato (y no con una insufrible demora de tres semanas) los efectos sobre la antigenicidad de cada tratamiento a que se someta un producto en estudio.

Pues bien, en nuestro laboratorio está en estudio esta correlación entre unos y otros trastornos. De lograr estos trabajos resultado positivo, el conocimiento logrado permitiría sospechar inmediatamente después de administrar por primera vez un suero o fármaco análogo si el paciente habrá de sensibilizarse específicamente a él, y, en caso afirmativo, ponerse a cubierto de los posibles trastornos subsiguientes a una segunda administración.

En todo caso, de poderse establecer un método precoz de apreciar el estado anafiláctico, tal método resultaría utilísimo como guía analítica en la búsqueda de métodos eficientes de desensibilización de fármacos antigénicos, porque aceleraría extraordinariamente el ritmo de la investigación. El método de que hoy disponemos, en cambio, podría reservarse para garantizar la calidad de los lotes de un producto que esté industrializado con destino a ser aplicado en clínica por vía parenteral; y también, naturalmente, a contrastar en los momentos oportunos el otro método en el curso de la labor experimental.

Para terminar, deseamos señalar de pasada una interesante dirección de la investigación que probablemente podrá esclarecerse, en parte, por el estudio de la correlación entre los trastornos primarios vinculados a la antigenicidad y los fenómenos del choque anafiláctico; es la de: 1) la causa de la distinta susceptibilidad de las distintas especies al choque anafiláctico; y 2) la causa de los distintos mecanismos del choque en las distintas especies. Nos limitamos a señalar la conexión entre estos problemas, que ya se apartan del tema de nuestro trabajo.

RESUMEN

1. El estudio de la desespeciación de sueros antitóxicos requiere contraponer paralelamente los efectos que los agentes de desespeciación aplicados ejerzan sobre las dos funciones antitóxica (útil) y anafiláctica (perjudicial), con el fin de lograr preparados que conserven la mayor parte posible de la primera función y hayan perdido en cambio todo lo posible la segunda. En un trabajo inmediato recogeremos nuestra experiencia sobre los efectos de diversos agentes sobre una y otra función. En este trabajo nos limitamos a considerar de modo general el modo conveniente de evaluar ambas funciones.

2. Se dan unas indicaciones someras (remitiéndonos a otros trabajos) de la valoración de la función antitóxica que no ofrece mayores dificultades para ser efectuado *in vitro* e *in vivo*.

3. A continuación se razonan las dificultades que hoy ofrece la valoración de la función anafiláctica, y que proceden: *a)* del desconocimiento de la esencia de la anafilaxia; *b)* del desconocimiento empírico de toda variable física, química o biológica que sea función de la capacidad anafilactizante; y *c)* de la imposibilidad de efectuar la valoración directamente y de la dificultad de extrapolar al hombre los resultados de valoraciones en animales.

4. Se dan normas para efectuar el método de que hoy puede disponerse para valorar la actividad anafiláctica de preparados destinados a ser administrados al hombre por vía parenteral. Dado que el animal de selección por múltiples razones para efectuar estas valoraciones, el cobayo, posee mucha mayor susceptibilidad al choque anafiláctico que el hombre, resulta imprescindible la aplicación a estas valoraciones de un producto testigo cuya actividad anafiláctica sobre el hombre esté previamente determinada por la experiencia clínica. Se dan las razones por las que es aconsejable elegir como producto testigo uno: *a)* que posea naturaleza análoga a la del producto que se evalúa; *b)* que ofrezca una capacidad anafilactizante que le haga admisible en la aplicación clínica. Con respecto a lo anterior, resultaría aconsejable que para orientar el perfeccionamiento de nuevos productos, los preparados antigénicos desensibilizados destinados a ser administrados por vía parenteral (sueros, etcétera) señalaran taxativamente: *a)* su procedencia animal; y *b)* el

método seguido en su desantigenización (aunque no se den, por razones comerciales, detalles de cómo éste se lleva a la práctica).

Las normas para efectuar el método conciernen a los tres puntos que hay que precisar para conocer su actividad anafiláctica frente a una determinada población humana; a saber: *a)* normas para determinar su poder sensibilizante; *b)* normas para determinar su poder desencadenante; y *c)* normas para determinar sus relaciones de especificidad anafiláctica con productos análogos existentes en el mercado que puedan interferir con el que se valora en crear estados de anafilaxia con especificidad común.

Con respecto a *a)* y *b)* se estudian las cualidades de un anafilactógeno en que radica su actividad sensibilizante y desencadenante con el fin de examinar el posible efecto que una acción química o física pueda tener sobre una y otra actividad. Se analizan las razones por las que una acción dada puede actuar destruyendo preferentemente la acción sensibilizante, y otra acción preferentemente, en cambio, la desencadenante. Se dan normas para evaluar experimentalmente una y otra actividad en un suero.

Con respecto a *c)*, nos interesa destacar que para hacer el estudio de las normas para determinar las relaciones de especificidad anafiláctica entre un suero y otros productos análogos, ha habido que efectuar un detenido análisis teórico de dos importantes cuestiones, y que en ambas se ha llegado a conclusiones satisfactorias originales.

Ante todo, al analizar la posible interferencia entre el suero que se estudie y otros sueros nativos o con restos de especificidad nativa, se ha hecho un examen del determinante inmunológico de las proteínas de vertebrados, estudiando algunas de sus características fundamentales a la luz de la comparación entre antígeno y proteína homóloga del animal inmunizado. Se enuncia que el determinante inmunológico es una diferencia primera entre el antígeno y la proteína propia que es homóloga del antígeno. Además, se señala la trascendencia que el estudio de este determinante de proteínas de vertebrados puede tener para entender, bajo nuestra interpretación, la diferenciación ontogénica (ausencia de parentesco inmunológico entre proteínas heterólogas de un mismo animal) y filogénica (las proteínas de una especie animal muestran, al ser inyectadas a animales de otra especie, un parentesco inmunológico con las proteínas homólogas de un conjunto de especies próximas a dicha segun-

da especie en el sistema natural, y este conjunto tiene un radio tanto mayor cuanto más separadas estén ambas especies en dicho sistema natural).

Al analizar la posible interferencia entre el suero en estudio y otros sueros (o productos proteicos en general) tratados de modo análogo a aquél, se ha examinado con detalle las características de la especificidad inducida por medios artificiales (determinante inmunoquímico o inmunofísico), y se da una explicación original del modo de crearse estos determinantes, explicación que permite someterlos por primera vez a unidad teórica con los determinantes naturales.

5. Para terminar, se dan las líneas generales de investigación proyectadas en nuestro laboratorio con el propósito de sustituir el método de valoración expuesto por otro que permita apreciar la creación del estado anafiláctico inmediatamente después de administrada la primera inyección del anafilactógeno.

SUMMARY

In the study of desespeciation of antitoxic serums is interesting to obtain preparations with correct antitoxic function and with short proportion of anaphylactic one.

The authors study the method to value the anaphylactic activity of serums that are administered by intramuscular injection and they project an investigation for their new method of anaphylactic valuation immediately after that the first anaphylactogen injection is verified.

BIBLIOGRAFIA

(1) F. Cordón y A. Martínez. 1954. Microb. Españ. 7, 265.
(2) A. B. Wadsworth. 1947. Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. 3.ª ed. Baltimore. Williams & Wilkins Co.
(3) G. Ramon. 1922. C. r. Soc. Biol. Paris. 86, 711.
(4) F. Cordón y A. Martínez. 1952. Microb. Españ. 5, 53.
(5) G. Ramon. 1940. Rev. Inmunol. 6, 65.
(6) R. Doerr. 1952. Las investigaciones sobre inmunidad. Tomo I. Los anticuerpos (Biblioteca Ibys de Ciencia Biológica). Madrid. Revista de Occidente, páginas 230-250.

(7) F. Cordón. 1954. Inmunidad y automultiplicación proteica (Biblioteca Ibys de Ciencia Biológica). Madrid, Revista de Occidente.

(8) A. Frey-Wysling. 1954. Submicroscopic Morphology of Protoplasm. La Haya. Elsevier Publishing Co.

(9) A. Frey-Wysling. 1956. Morfología submicroscópica del citoplasma (Biblioteca Ibys de Ciencia Biológica). Madrid, Revista de Occidente.

(10) F. Cordón. Significación biológica de los enzimas tal como resulta de los hechos de inmunidad (Conferencia pronunciada el 14 de marzo de 1956 en un cursillo sobre enzimas organizado por la Facultad de Medicina de Barcelona; en prensa actualmente la serie de conferencias del cursillo).

F. Cordón. Examen de los determinantes inmunológicos de las proteínas de vertebrados (Conferencia pronunciada el 7 de junio de 1956 en el Instituto «Luis Vives» de Madrid).

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

ACCION DE LOS AGENTES QUIMICOS SOBRE LOS VIRUS Y EXPERIENCIAS CON EL ANTIVARIOLICO CULTIVADO EN HUEVOS DE GALLINA

POR

M.ª Luisa Alonso.

Los antisépticos coagulantes y oxidantes actúan sobre la mayoría de los virus como si ellos estuviesen constituídos por un complejo de sustancias proteicas dotadas de una cierta organización.

Las experiencias practicadas con algunos antisépticos y los virus poliomielítico y herpético han demostrado que sobre el primero (1), el mentol en polvo, el permanganato potásico al 1/1000 y el aldehido fórmico y el agua oxigenada al 1/1000, suprimen fuera del organismo sus propiedades patógenas, en tanto que el timol y el fenol al 5/100 se muestran inactivos. Los experimentadores americanos Olitsky y Cox (2), y también Sabin, Olitsky y Cox (3), Armstrong y Harrison (4) y Schultz y Gebhardt (5), han utilizado en instilaciones nasales el ácido pícrico, el alumbre, el tanino y el mercurocromo, para dificultar la penetración del germen de la parálisis infantil por la vía nasofaríngea. Por lo que respecta al virus herpeto-encefalítico, sabemos, por los trabajos de Levaditi y Harvier (6), que el ácido fénico al 1/100 no modifica la virulencia después de quince minutos de contacto invitro, y que lo destruye completamente después de tres días. Los mismos autores, en colaboración con Nicoláu (7), han demostrado la inactividad del timol y del aceite mentolado y revelado la influencia virulícida del permanganato potásico al 1/1000. Estos trabajos fueron confirmados por Mariani y Bruni (8 y 9). Sobre el virus de la fiebre aftosa hizo interesantes experiencias con el formol Homutov (10), y sobre el vacunal, Yaoi y Kasai con el fenol (11).

El virus del mosaico del tabaco ha sido sometido por Stanley (12) a la acción de 110 antisépticos en estado nativo, o bien después de purificado. Este virus, que resiste la acción del alcohol y de la acetona, es destruído por ciertos compuestos oxidantes o coagulantes de las materias protei-

cas. La acción virulicida oxidante es definitiva, ya que no puede ser reversible por la adición de principios reductores tales como la cisteína. El hecho, dice Stanley, de que el virus del mosaico del tabaco muera bajo la acción de los coagulantes de las proteínas, parece indicar que estas últimas entran en la constitución del elemento patógeno.

Bilis. Los elementos químicos que entran en la constitución de la secreción biliar anulan en ciertas condiciones la actividad patógena de los virus (trabajos de Kraus, Eisler, Rous, Neufeld y Prowazek (13), (14), (15), (16). En lo que concierne al virus poliomielítico, Landsteiner, Levaditi y Pastia (17) han conseguido resultados negativos, en tanto que Leiner y Wisner (18) apreciaron una cierta influencia virulicida. Por el contrario, el virus del herpes pierde su propiedad queratógena y encefalitógena si se le mezcla previamente con bilis (Levaditi y Harvier (19).

Ciertos agentes químicos, tales como el éter sulfúrico, el verde brillante, el mercurocromo, etc., tienen un alto poder bactericida, en tanto que su actuación sobre los virus es más o menos moderada. De este hecho partió Noguchi para liberar de gérmenes bactéricos las linfas vacunales por medio del éter sulfúrico, y después inocular en testículo de conejo, para así lograr un virus puro testicular lapino (20). El verde brillante, de moderada acción virulicida, es utilizado hoy día unido a la glicerina para depurar las linfas vacunales de ternera de una gran parte de los gérmenes bactéricos que las impurifican. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este colorante y antiséptico, lo mismo que el mercurocromo, atenúan, en contacto prolongado, la actividad del virus en diluciones menores al 1/10000, razón por la cual las linfas así tratadas suelen fracasar en las revacunaciones.

Hammon y Reeves (21), ante las frecuentes contaminaciones de los sueros destinados a fines diagnósticos, buscaron agentes bacteriostáticos que previniesen o suprimiesen tales contaminaciones sin inactivar los anticuerpos de los sueros, ni los virus problemas en las pruebas de neutralización. A este respecto investigaron varios productos, hasta seleccionar uno para su empleo sistemático. Los sueros y el virus con el agente bacteriostático se incubaron durante dos horas a 37° C. antes de hacer las inoculaciones correspondientes. Los ensayos los efectuaron con los virus de la encefalitis de San Luis, encefalitis equina tipo Oeste y poliomielitis. También hicieron algunas pruebas con los virus de la encefalitis Japonesa B y con el de la equina tipo Este.

Con el virus de San Luis realizaron dos series de pruebas utilizando el *Zephiron* (cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonium) con una dilución final en el suero al 1 por 10000; el *mertiolato*, a igual dilución, y el *sulfotiazol sódico* al 1 por 500 (0,2 por 100). El contacto del virus con estos productos se atenuó su actividad patógena. Sin embargo, el sulfotiazol resultó inestable en las soluciones, y tóxico al cabo de varios días, lo que se manifestó en los ratones inoculados por convulsiones y en algunos de ellos por muerte. Los ensayos realizados con los mismos productos y el virus de la encefalitis equino tipo Oeste, les dieron resultados semejantes a los obtenidos con el virus de San Luis. Los virus de San Luis y equino tipo Oeste fueron también sometidos a la acción del *cianuro de mercurio* en dilución final al 1 por 10.000, sin que se observasen notables diferencias entre los grupos de ratones inoculados después de contacto con el antiséptico y los grupos testigos. El virus de la poliomielitis fué también sometido a la acción del cianuro de mercurio en dilución al 1 por 10.000, sin que se apreciasen efectos atenuantes de su poder patógeno en dos horas de contacto a temperatura de 37° C.

El *borato-fenil-mercúrico* fué investigado sobre los virus de San Luis, equino Oeste, y poliomielítico hasta una dilución final al 1 por 50.000. Primeramente prepararon una dilución en solución salina al 1 por 2.500 para añadirla al suero. Las mezclas de virus-sueros se incubaron durante dos horas a 37° C. Este producto tampoco tuvo efecto alguno sobre los virus indicados. Después de haber ensayado este producto químico en diluciones al 1 por 10.000, Hammon y Reeves lo recomendaron para ser añadido a todos los sueros que les remitían para pruebas de neutralización, ya que todos los ensayos realizados dieron un resultado totalmente satisfactorio. Este producto lo escogieron para su uso sistemático.

En la práctica, a cada tubo de suero se añade antes de guardarlo una gota de la dilución al 1 por 2.500 por cada centímetro cúbico. Los sueros se almacenan después a una temperatura de 5° C. aproximadamente. De 1.000 muestras de sueros preservados en la forma indicada con el borato-fenil-mercúrico, sólo ocho resultaron contaminados, a pesar de que algunos de ellos fueron empleados varias veces para realizar pruebas de neutralización. Cierto número de sueros que contenían el borato-fenil-mercúrico fueron utilizados en las pruebas de neutralización con los virus Japonés B, Este y California, sin que en ningún caso se apreciasen efectos desfavorables. Este producto en diluciones al 1 por 50.000 no dió

lugar a interferencia alguna en las numerosas pruebas de neutralización que realizaron, ni efectos atenuantes sobre los virus ensayados, así como en las experiencias que hicieron con el virus de la parotiditis epidémica. Tampoco alteró en lo más mínimo las condiciones de los sueros que se utilizaron en las pruebas de fijación de complemento.

Glicerina. Entre los numerosos agentes químicos ensayados, es indiscutible que la glicerina pura o adicionada de agua destilada, solución salina, o diluciones de fosfatos ajustada al pH conveniente, es el producto más utilizado para conservar los virus fuera del organismo. En 1886, Müller (22), del Instituto de Vacunación de Berlín, mezcló las pulpas dérmicas de ternera con glicerina, observando que a largo plazo suprimía un gran número de gérmenes bactéricos, sin apreciable pérdida de virulencia. Posteriormente se ha podido determinar por experiencias de numerosos investigadores que todos los virus pueden ser conservados en medios glicerinados, con la sola excepción del linfogranuloma inguinal. La duración de la conservación de los virus en la glicerina depende, en gran parte, del pH utilizado.

La técnica usual consiste en preparar tubos con 8 ó 10 c. c. de glicerina pura (30° Beaumé) estéril, donde se depositan los tejidos virulentos, almacenándolos después en la fresquera (a + 5° C.). La acción conjugada de la glicerina y de la baja temperatura permite asegurar la supervivencia de los virus durante un tiempo prolongado, que habitualmente oscila entre varias semanas a varios meses. Antes de utilizar los fragmentos conservados en glicerina, conviene lavarnos con solución salina para eliminar el exceso de glicerina.

En estado de pureza, la glicerina tiene el inconveniente de su gran poder deshidratante y antiséptico, que a más de actuar sobre las bacterias atenúan los virus, y sabido es el alto grado de acidez de las glicerinas comerciales. Todos estos factores hacen que tanto las glicerinas químicamente puras como las comerciales alteren en mayor o menor grado las propiedades patógenas de los virus.

La experiencia ha demostrado que la acción conservatriz de la glicerina no es debida a su acción deshidratante, pues hidratada continúa ejerciendo su acción protectora sobre los virus. A esto se debe el uso corriente de la glicerina pura diluída al 50 por 100 en agua destilada o solución salina, con lo que se atenúan notablemente los efectos nocivos sobre los virus y se prolonga la vitalidad de los más delicados. Estos resultados se mejoran

notablemente si la dilución se hace en un tampón de fosfatos destinado a corregir la acidez de algunas glicerinas y a mantener los tejidos en un pH favorable, generalmente vecino a la neutralidad. En estas condiciones, los tejidos se conservan durante mucho tiempo con una apariencia y coloración normales.

Preparación de las glicerinas fosfatadas (23). La glicerina fosfatada ideal es la mezcla a partes iguales de una glicerina pura y de una solución tampón de fosfatos destinada a mantener el pH del medio a un valor determinado y constante. La llamada glicerina pura comercial no es jamás neutra, razón por la cual es conveniente determinar el grado de acidez. Para ello, se mezclan las muestras de glicerinas con partes iguales de agua destilada neutra y se determina el pH. Las mezclas débilmente ácidas tendrán un pH superior a 5,5, y las fuertes ácidas, inferior a 5,5. La proporción de fosfatos a añadir variará ligeramente según estas dos eventualidades.

Soluciones madres.

1.°	Difosfato de sosa cristalizado...	166,42	grs.
	Agua destilada	1.000	»
2.°	Monofosfato potásico cristalizado...	136,16	»
	Agua destilada	1.000	»

Estas soluciones se conservan en frascos bien cerrados, utilizándose las fórmulas siguentes para la preparación de las glicerinas:

1.° Glicerina débilmente ácida.

Solución de difosfato de sosa cristalizado	17,5	c. c.
Solución de monofosfato potásico cristalizado ...	7,5	»
Agua destilada	475	»
Glicerina	500	»

El producto final corresponde a un litro de glicerina fosfatada al 50 por 100 con un pH de 7,1.

2.° Glicerina muy ácida.

Solución de difosfato de sosa cristalizado	40	c. c.
Solución de monofosfato potásico cristalizado ...	10	»
Agua destilada	450	»
Glicerina	500	»

El producto final corresponde a un litro de glicerina fosfatada al 50 por 100 con un pH de 7,1.

Las glicerinas fosfatadas así obtenidas se reparten en frascos o matraces y se esterilizan en autoclave.

Cisteína. Entre los agentes químicos utilizados para la conservación de los virus, la cisteína ocupa uno de los primeros lugares. Su acción ha sido particularmente estudiada por Zinsser y Tang (24) en el herpes, y por Mc Kinnon (25) en la vacuna. El virus vacunal puesto en contacto con una solución de cisteína al 1 por 1.000 a temperaturas de 2.° C. a 5° C. y de 18° a 22° C. pierde menos actividad que el mismo virus conservado en glicerina. Según Zinsser y Seastone (26), los virus inactivados por oxidación recuperan su actividad patógena bajo la influencia de un agente reductor tal como la cisteína.

Influencia del pH. La actividad patógena de los virus conservados in-vitro está íntimamente relacionada con el pH del medio.

Entre los numerosos trabajos efectuados con el fin de precisar las condiciones óptimas en relación con el pH, merecen citarse los de Yaoi y Kasai (27), demostrando que la actividad del virus vacunal decrece en relación de la acidez del medio. Según estos investigadores, el límite de viabilidad del virus está comprendido entre el pH 4,5 y el pH 8,8, y el óptimo, entre el pH 7,5 y el pH 8,5.

En lo que concierne a los virus de la fiebre aftosa, estomatitis vesicular y la rabia, su comportamiento a la acción de la alcalinización o de la acidificación del medio, ha sido precisada por Pyl (28). La curva de actividad del virus aftoso presenta dos máximos: uno, hacia el pH 7,5 a 7,7, y otro, hacia el pH 3. Ahora bien: esta curva difiere esencialmente de la del virus de la estomatitis vesicular y la rabia. Algunos datos también interesantes referentes a la pérdida de actividad del virus del mosaico del tabaco según el pH utilizado, han sido facilitados por Stanley. A 20° C. la pérdida de actividad es muy lenta entre los pH 3 y 8, bastante más rápida entre los pH 1,5 y 2,5 y entre los 9 y 10. Por último, entre los pH 0,5 y 1,5 y entre los 11 y 12, muy rápida.

PARTE EXPERIMENTAL

Para nuestras experiencias hemos elegido un virus antivariólico puro de tipo embrionario, que, como es sabido, es mucho más sensible a la

acción de los agentes físicoquímicos que el dérmico de ternera, y en el que, por tanto, se podrá determinar mejor la acción de las sustancias químicas ensayadas sobre la vitalidad del virus, y la influencia del pH del medio en la mayor o menor supervivencia, siempre, como es natural, en relación con la temperatura y tiempo de contacto.

Material y técnicas.

Inicialmente partimos de una pulpa dérmica de ternera muy activa (fig. 1) y de flora bacteriana normal.

Dos gramos de esta pulpa fueron triturados finamente en mortero con arena de río lavada y estéril, incoporando seguidamente con lentitud 50 c. c. de caldo glucosado al 1 por 100, que se ajustó exactamente a pH 8. Esta suspensión se centrifugó durante diez minutos a 5.000 revoluciones, y retirado el líquido sobrenadante, se filtró por bujía Mandler de poro regular, a presión negativa (fig. 2) (técnica de Monteiro y Godinho (29). Una vez comprobada la pureza del filtrado por siembra en caldo común y agar-sangre y riqueza en virus, por punturas intradérmicas en piel de conejo (técnica de Groth (30), procedimos a inocular 0,50 c. c. de este filtrado activo en masa testicular de un conejo adulto. La orquitis vacunal se apreció ya en los dos testículos inoculados al tercer día, llegando al máximo de intensidad al quinto. Extirpados los testículos previo sacrificio del animal, se pesaron cuidadosamente, y, una vez triturados en mortero con arena, se añadió solución salina hasta lograr una suspensión al 1 por 100. Comprobada la esterilidad y actividad en la misma forma que lo hicimos con el filtrado, tanto éste como la suspensión testicular se repartieron en ampollas conteniendo de 1 a 3 c. c., que, una vez sometidas a una intensa liofilización, se almacenaron para ser utilizadas en las experiencias.

Para obtener el virus testicular de conejo no seguimos la técnica clásica de Noguchi de tratar las linfas vacunales por medio del éter sulfúrico, con el fin de eliminar los gérmenes bactéricos que las impurifican. Tal proceder es de inseguros resultados y lenta ejecución, ya que para lograr una orquitis intensa se necesitan de 5 a 6 pases testiculares, en tanto que inoculando un filtrado rico en virus no debilitado por la acción del éter, se consigue siempre intensa reacción testicular desde la primera inoculación (fig. 3). De todos modos, la técnica de Noguchi tiene

el indiscutible mérito de haber proporcionado la primera auténtica linfa antivariólica libre de toda clase de gérmenes bactéricos. Esta linfa, por su enorme virulencia y mal aspecto, no pudo ser aplicada en la vacunación humana, mas sirvió y sirve en la actualidad como semilla para la vacunación de terneras (Illera y Gallardo (31) y de punto de partida para la obtención de otras linfas puras (neurovacuna (32) (fig. 4), vacuna de embriones (33 (figs. 5 y 6). Contando ya con dos cepas de virus puros, la de filtrado y la de testículo de conejo, procedimos a efectuar una serie de inoculaciones en huevos de gallina incubados con el fin de obtener las pulpas embrionarias para nuestras experiencias.

Técnica seguida (34-35-36-37).

Lotes de 18 a 24 huevos fecundados de diez a doce días de incubación fueron inoculados con diluciones al 1/10 en caldo común del filtrado, o al 1/60 — 1/100 del virus testicular, en la cantidad de 0,25 c. c. por huevo. Para ello, una vez comprobada por transiluminación la perfecta vitalidad de los embriones, se aseptiza con tintura de iodo y alcohol una pequeña zona de la cáscara del polo romo de los huevos (que normalmente corresponde a la cámara del aire), y con la punta aguda de una tijera, o bien con fresa y torno de odontólogo, se perfora la cáscara, penetrando por el agujero practicado con la aguja armada en un jeringa, de la capacidad conveniente al número de huevos que tengamos que inocular, hasta el saco vitelino (tope de una aguja corriente, 23 ó 24 milímetros). Tapada con parafina la pequeña puntura practicada, se colocan nuevamente los huevos en estufa o incubadora. Los embriones muertos en los tres primeros días consecutivos a la inoculación no los aprovechamos, por ser poco ricos en virus; los muertos al cuatro-quinto y sexto días son los que mayor cantidad de virus acusaron en las pruebas de valoración practicadas en piel de conejo. También son utilizables los embriones que superviven al sexto día, fecha en que son abiertos todos los huevos.

Para recoger el material embrionario, se practica una pequeña picadura con la punta aguda de una tijera en la cáscara de la cámara de aire, penetrando en ella y cortando todo el casquete a nivel del corion que forma la base. Desprendido éste con una pinza fina, se desgarra con la misma la alantoides, se vierte el contenido del huevo en una placa de

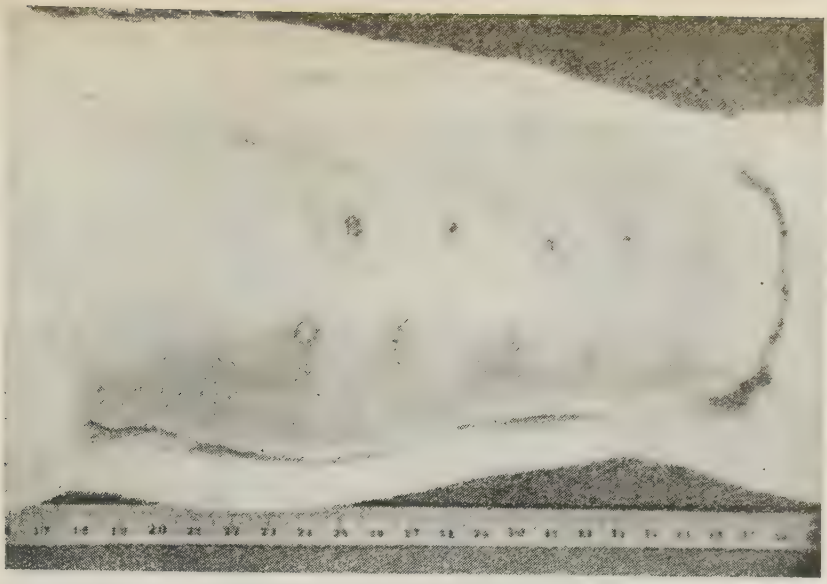


FIG. 1.
Comprobación de la actividad de una pulpa de ternera comparándola con un lote de pulpa de embriones (observación al quinto día).

FIG. 2.
Dispositivo de filtración a presión negativa con bujía Mandler.

FIG. 3.
Intensa orquitis vacunal producida por la inoculación de un filtrado de pulpa de ternera muy rico en virus (observación al quinto día).

FIG. 4.
Obtención de neurovacuna. Fase paralítica de un conejo inoculado por vía intracerebral con virus testicular (observación al cuarto día).

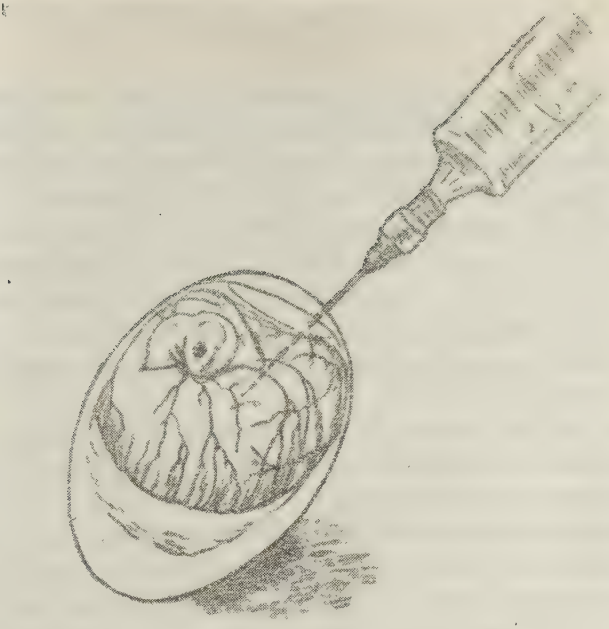


FIG. 5.
Esquema de inoculación en saco vitelino, según técnica de Cox.

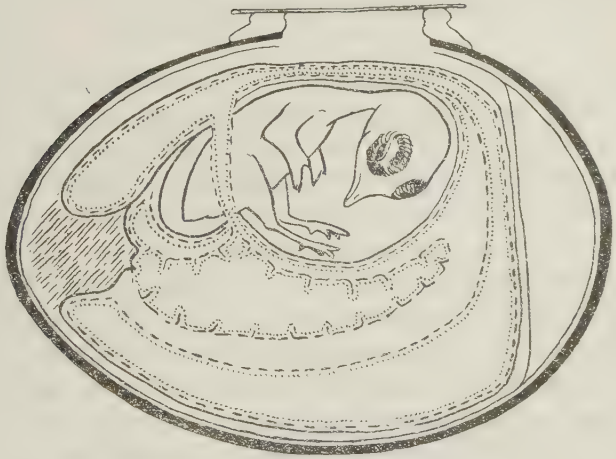


FIG. 6.
Esquema de inoculación en alantoides, según técnica de Wooddruff y Goodpasture, y disposición de los distintos elementos de un huevo de gallina al décimo o doceavo día de inoculación.

Petri, y si al invertirlo no se desprende la membrana alantoidea, se hace esto con la pinza. Estando ya todos los elementos de los distintos huevos an su placa correspondiente, se separan de ellos los elementos que vamos a utilizar, depositándolos en frascos de boca ancha.

Siguiendo esta técnica hicimos *cuatro* lotes de pulpas de alantoides y embriones sin cabeza ni extremidades: *uno,* de alantoides; *uno,* de vísceras y cerebros, y *uno,* con los cuerpos de los embriones sin vísceras. Estos elementos embrionarios fueron triturados en Turmix, y las pulpas resultantes, una vez comprobada su pureza y actividad, almacenadas en nevera a —20° C.

Como las pulpas embrionarias son fácilmente contaminables, es indispensable actuar con las mayores precauciones de asepsia, tanto de material y ambiente como del personal.

Para obtener nuestros siete lotes de pulpas embrionarias puras se pusieron a incubar 540 huevos fecundados de gallina, de los cuales un 35 o un 40 por 100 no llegaron a completa incubación, bien por muerte de los embriones antes de los diez o doce días, o bien en una menor proporción, por no estar realmente fecundados los huevos.

Determinación de la actividad patógena de los distintos lotes, antes y durante las experiencias.

Para estas valoraciones hemos utilizado la técnica de puntura intradérmica de Groth, que reúne, para los fines de nuestras experiencias, las ventajas siguientes: 1.ª El poderse medir exactamente la cantidad de virus que deseamos inocular. 2.ª El ofrecernos la seguridad de que el virus inoculado se pone en contacto con los elementos dérmicos más receptivos. 3.ª El ser pequeñísima la cantidad de virus que se pierde si la puntura se ha practicado bien; y 4.ª El poder practicar en un solo conejo un gran número de punturas (10 ó 12). Esta última ventaja de la técnica de Groth, a más de suponer una gran economía en animales, disminuye los errores inevitables de la distinta receptividad individual, ya que algunas de las experiencias pudieron ser realizadas en un solo animal. Para cada lote fueron necesarios un promedio de 30 conejos, sin contar los que fueron desechados antes de su utilización por encontrarnos con pieles muy pigmentadas donde las lesiones no se manifiestan con claridad. El conseguir animales jóvenes, bien nutridos y con piel blanca,

fué una de las mayores dificultades encontradas en el curso de nuestros trabajos. De haber utilizado la técnica de escarificación cutánea de Calmette y Guerin (38), estas dificultades hubiesen sido insuperables para nosotros por el enorme número de animales que hubiésemos tenido que utilizar, ya que en cada conejo no es aconsejable hacer más de dos inoculaciones (una en cada flanco).

Productos químicos empleados en nuestras experiencias.

Como las pulpas antivariólicas que habíamos de someter a la acción de los agentes químicos estaban completamente libres de gérmenes bactéricos, elegimos para las experiencias sustancias de moderada acción bactericida, pero capaces de evitar contaminaciones accidentales y que fuesen a su vez menos agresivas al virus vacunal embrionario. Estas sustancias fueron: la glicerina, la cisteína, el veronal-veronal sódico y el veronal sódico.

Preparación de las soluciones empleadas.

Glicerina. Utilizamos este producto por ser el de uso universal para la conservación de los virus. La preparamos diluída al 50/100 con soluciones reguladoras de fosfatos y de glicocola.

Solución de fosfatos para las mezclas reguladoras. Serie A.

Solución 1.ª Fosfato potásico primario diluído en agua destilada en proporción de la quinceava parte del peso molecular por litro. Esto es: 9,087 grs. de PO_4H_2K.

Solución 2. Fosfato sódico secundario diluído en agua destilada en la proporción de la quinceava parte del peso molecular por litro. Esto es: 11,976 grs. de $PO_4HNa_2.2H_2O$.

Mezclas reguladoras preparadas con la serie A.

para el pH 5. { Solución 1.ª = 99,05 c. c.
Solución 2.ª = 0,95 c. c.

para el pH 6. { Solución 1.ª = 87,90 c. c.
Solución 2.ª = 12,10 c. c.

para el pH 7. { Solución 1.ª = 38,80 c. c.
Solución 2.ª = 61,80 c. c.

para el pH 8. { Solución 1.ª = 3,10 c. c.
Solución 2.ª = 96,90 c. c.

Como necesitábamos preparar una solución tamponada a pH, 9 y no se llega a ese pH con las mezclas fosfatadas, tuvimos necesidad de prepara una mezcla reguladora a base de glicocola décimo normal: Solución 3.ª, y la de sosa décimo normal: Solución 4.ª

Para el pH 9 las mezclas reguladoras fueron las siguientes:

pH 9 { Solución 3.ª = 87,6 c. c.
Solución 4.ª = 12,4 c. c.

Para preparar las soluciones tamponadas de glicerina se añadió a ésta un volumen igual de las mezclas reguladoras correspondientes, conservándose bien tapadas a temperatura ambiente.

Otra serie de fosfatos para las mezclas reguladoras. Serie B.

Solución 5. Fosfato potásico secundario diluído en agua destilada en la proporción del doble de su peso molecular partido por 15 (2pm/15) por litro. O, lo que es lo mismo, 23,488 grs. por litro de PO_4HK_2.

Solución 6.ª Fosfato sódico primario diluído en agua destilada en la proporción del doble de su peso molecular partido por 15 (2pm/15) por litro. O, lo que es lo mismo, 18,36 grs. por litro de $PO_4H_2Na.2H_2O$.

Mezclas reguladoras preparadas con la serie B de fosfatos.

para el pH 5. { Solución n.º 5 = 0,475 c. c.
Solución 6.ª = 49,525 c. c.

para el pH 6. { Solución n.º 5 = 6,05 c. c.
Solución n.º 6 = 43,95 c. c.

para el pH 7 { Solución n.º 5 = 30,6 c. c.
Solución n.º 6 = 19,4 c. c.

para el pH 8 { Solución n.º 5 = 48,45 c. c.
Solución n.º 6 = 1,55 c. c.

Para preparar la solución tamponada a *pH 9* se hicieron previamente una de glicocola veinte normal y otra de sosa veinte normal, que denominamos Soluciones 7.ª y 8.ª, respectivamente.

para el pH 9. { Solución n.º 7 = 87,60 c. c.
Solución n.º 8 = 12,40 c. c.

Las soluciones tamponadas de glicerina preparadas con la Serie B se efectuaron en las mismas condiciones que las de la Serie A.

Solución de cisteína. Serie C.

En un medio de solución salina-agar al 2/100 se diluye la cisteína en la proporción de 1/1000. Distribuída en cinco matraces, se ajusta cada porción a los pH 5-6-7-8 y 9, añadiendo cantidades crecientes de sosa décimo normal. Seguidamente se esteriliza en autoclave a vapor fluente, y una vez comprobados nuevamente los pH, se conservan los matraces en nevera a + 6° a 8° C., hasta el momento de preparar los triturados embrionarios.

Soluciones de veronal-veronal sódico. Serie D.

Al mismo medio agar-solución salina utilizado para la cisteína, se añade 2,5/1000 grs. de veronal. Distribuída la cantidad preparada en cinco matraces, y se ajusta el contenido de cada uno de ellos a los pH 5-6-7-8 y 9, añadiendo cantidades crecientes de una solución madre de veronal sódico al 5/100. Esterilizado el contenido de los matraces a vapor fluente, y hecha seguidamente nueva comprobación de los pH, se almacenan en nevera hasta el momento de hacer los triturados.

Soluciones de veronal sódico. Serie E.

Para conseguir mezclas tampón en una zona de pH que varía de 2 a 9, se mezcla una solución madre de veronal sódico y acetato sódico, con cantidades crecientes de ClH O'1n.

Estas mezclas tienen la ventaja de poder utilizar el mismo tampón para toda la experiencia y por contener ClNa (cloruro sódico) en cantidad isotónica, mantiene los tejidos y virus en condiciones ideales.

Solución madre.

Es una solución 1/7 molar de veronal sódico y de acetato sódico. Para conseguirla se pesan 9,714 grs. de acetato sódico y 14,714 grs. de veronal-sódico con 3 H_2O, y se disuelven en agua desprovista de CO_2 en centímetro cúbico hasta 500 c. c. Cinco centímetros cúbicos de esta solución se mezclan con 2 c. c. de una solución de ClNa al 8,5 por 100 (en total, 7 c. c.), y con *a* c. c. de ClH O'1n y (18-*a*) c. c. de H_2O:

La tabla siguiente nos da los valores de *a* y los pH correspondientes.

a	pH	*a*	pH
0	9,64	6,5	6,75
0,25	9,16	7	6,12
0,5	8,90	8	5,32
0,75	8,68	9	4,93
1,0	8,35	10	4,66
2,0	8,18	11	4,33
3,0	7,90	12	4,13
4,0	7,66	13	3,88
5,0	7,42	14	3,62
5,5	7,25	15	3,20
6,0	6,99	16	2,62

(Continuará.)

UNIVERSIDAD DE BARCELONA. FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO Y CONTROL ANALITICO MICROBIOLOGICO DEL PAPEL MONEDA

POR

E. GASTÓN DE IRIARTE y M.ª LOURDES LLOVERAS.

CRITERIO Y MOTIVOS QUE HAN ORIGINADO EL PRESENTE TRABAJO

Por considerar el papel moneda uno de los principales agentes transmisores de las enfermedades infecciosas, en su doble papel de transportador de gérmenes patógenos y saprofitos y como medio propicio para el desarrollo de los mismos, por la cantidad de materia orgánica, polvo, humedad, etc., y condiciones ambientales en que se guardan, y por ser norma habitual que periódicamente se viene realizando en otros países, hemos creído interesante el estudio del control analítico microbiológico del papel moneda de curso legal en España.

Al mismo tiempo se ha efectuado un estudio comparativo con las monedas metálicas de curso legal, tanto en nuestro país como en los demás.

Como hemos indicado anteriormente, en la fábrica de la moneda de otros países o en el Banco Central de los mismos, es costumbre—incluso legislado en alguno de ellos—el control bacteriológico periódico del papel moneda, con objeto de renovar o retirar de circulación aquellos billetes que se consideran un peligro desde el punto de vista social, por creerlos agentes propagadores de gérmenes que en ciertas condiciones o momentos podrían ser patógenos y peligrosos para la salud pública.

Aparte de esto, y por los resultados obtenidos, no queremos dejar de mencionar nuestra opinión e interés que desde el punto de vista pedagógico puede tener este control.

Este último criterio lo sostenemos en virtud de como es por todos conocida la resistencia que presentan algunos de los alumnos de nuestra Facultad cuando por primera vez practican en los laboratorios de Microbiología. Estos alumnos no tienen conocimiento de los peligros de con-

taminación y medio de contagio de los gérmenes que se les dan para el estudio de los caracteres morfológicos, coloración, metabolismo y aislamiento, tanto «in vitro» como «in vivo» de algunos de ellos. Sin embargo, hemos podido comprobar en muchísimas ocasiones que estos mismos alumnos no ponían ningún reparo a tratar de aislar e identificar los gérmenes existentes en el papel moneda; por este procedimiento hemos conseguido que trabajasen con gérmenes patógenos, algunos de los cuales ni nosotros mismos nos hubiésemos atrevido a entregar a estos alumnos que se inician en los trabajos que se efectúan en nuestros laboratorios de Microbiología.

El presente trabajo, realizado en colaboración, ha sido efectuado en los laboratorios de la Sección de Bacteriología de Barcelona del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y en los de la Cátedra que regenta el primer firmante.

Los resultados y conclusiones a los que hemos llegado en este estudio son los obtenidos después de tres años de análisis de unas 5.000 pesetas de diferentes papeles moneda, fundamentalmente billetes de una, cinco, veinticinco, cincuenta y cien pesetas, aunque también se han efectuado numerosos análisis de quinientas y mil pesetas. Si se ha hecho mayor número de análisis del que se necesitaban, era precisamente para establecer una media más exacta y comparativa de los resultados obtenidos, tanto con el papel como con moneda metálica de curso legal.

Además, como más adelante expondremos, están el hecho por nosotros observado de la acción oligodinámica ejercida por las tiras metálicas de los billetes que la contienen, y el estudio comparativo de esta misma acción oligodinámica, tanto en las monedas de curso legal actuales como con las anteriores existentes ya en España, ya en otros países.

TECNICA

La técnica por nosotros seguida ha sido:

Con billetes en circulación en diferentes períodos o edades de la misma, es decir, con billetes facilitados por el Banco de España, que salían por primera vez a la circulación. con billetes de diferente tiempo de circulación, desde unos meses hasta algunos con dieciocho años.

Esto ha servido para que pudiésemos ver y comprobar las curvas de contaminación de cargas de gérmenes, como asimismo el resultado analítico obtenido de la flora microbiana nos ha indicado, en algunos ca-

sos, la última procedencia del billete; ejemplo, en el caso en el cual se ha podido aislar *Pseudomonas phosphorescens* y *Bacillus sardinae*, que comprobamos posteriormente procedía de una pescadería.

Como material a analizar, se ha partido de billetes de una peseta en más o menos peor estado, de cinco pesetas, de veinticinco y cincuenta. Esto ha permitido una comparación cuantitativa de los gérmenes hallados. Todo el instrumental usado en esta práctica ha sido previamente esterilizado en horno Pasteur, a fin de evitar cualquier error de contaminación, los medios utilizados han sido preparados siguiendo los datos de los métodos «standard» y la sistemática propuesta por el «Bergey's Manual» (6.ª edición).

Hemos troceado un billete de una peseta de curso libre y legal que pasamos a un mortero estéril, donde se macera con unos centímetros cúbicos de solución fisiológica estéril, se lleva a un matraz estéril, completando hasta 100 c. c., y se deja madurar veinticuatro horas en estufa. Pasado este tiempo, se filtra estérilmente y se procede a la siembra en agar caldo en placa Petri por agotamiento, y también en placa agar a diferentes diluciones. Se lleva a cabo una repetición de lo anteriormente expuesto, pero haciendo la siembra directa, sin dejar en estufa veinticuatro horas, evitando así una concentración de gérmenes. Los cálculos darán resultados diferentes.

Separadamente se hace un examen en gota pendiente del líquido procedente de la maceración, observándose una gran variedad y enorme pululación de gérmenes, así como fibras, impurezas, etc.

Medios de cultivo empleados.

Aparte del agar caldo ya mencionado, se han usado para las siembras agar sangre, medio Sabouraud, patata glicerinada, Czapek, Wilson Blair, Brewer, Loewenstein, medios sólidos que han permitido obtener colonias aisladas, las cuales, a su vez, se han resembrado para obtener cultivos puros. Como medios líquidos se han usado caldo común, caldo glucosado, caldo bilis, agua de peptona, etc.

Hemos hecho una siembra en agar caldo, el cual, una vez homogeneizado con un centímetro cúbico de filtrado, se ha llevado a 100° durante cinco minutos para lograr el crecimiento de gérmenes esporulados.

Por otra parte, se ha sembrado en agar ordinario añadido de unas go-

tas de solución de penicilina a 5.000 U. O., lo que ha permitido eliminar mucha flora asociada.

También se ha tratado un volumen del filtrado con ácido sulfúrico al 10 por 100, otro volumen con antiformina para facilitar el desarrollo aislado de gérmenes ácido alcohol resistentes; todos estos estudios los detallaremos en la parte descriptiva.

Todas las siembras en medios normales, medios enriquecidos, medios específicos, medios más o menos selectivos, han sido numerosas y han tenido que ser repetidas muchas veces hasta lograr un cultivo de cada una de las diversas especies halladas, puro y abundante.

Hemos tenido que observar las máximas condiciones de esterilidad —en las manipulaciones—para evitar cualquier posible contaminación.

Temperaturas a las que se ha trabajado.

Los medios sembrados se han incubado a temperaturas de 38, 37 y 22° y ambiente. Una vez clasificado cada uno de los gérmenes hallados, sus cultivos puros ya en medios generales, ya en medios selectivos, se han cultivado a la temperatura supuesta óptima para ellos.

Para la clasificación de cada uno de los cultivos puros obtenidos, se han seguido las normas establecidas en la hoja descriptiva aprobada por la Sociedad Americana de Bacteriólogos en la reunión del 28 de diciembre de 1934, presentada por M. W. Jennison y H. J. Conn.

DESCRIPTIVA

Cultivo A.

Aerobio. Temperatura, 37°; óptima, 30°; pH neutro y pH 6.

Agar placa.—Colonias grandes apigmentadas aun después de veinticuatro horas a temperatura ambiente, circulares, opacas y adherentes.

Agar inclinado.—Crecimiento abundante, adherente, opaco, superficie algo arrugada.

Gelatina.—Se licúa rápidamente.

Caldo.—Turbidez, luego se aclara y forma una película en la superficie.

Voges-Proskauer.—Positivo.
Nitratos a nitritos.—Positiva.
Almidón.—Hidrolizado.
Leche tornasolada.—Formación de cuajo.
Indol.—Negativo.
Patata.—Gran desarrollo.

Fermentación y acidez.

Xilosa:	+ +	Lactosa:	— —	Glicerina:	+ +
Galactosa:	+ +	Sacarosa:	+ +	Manitol:	+ +
Glucosa:	+ +	Maltosa:	+ +		
Ramnosa:	± ±	Rafinosa:	± ±		

Morfología.—Forma bacilar, de extremos redondeados, aislado en cadenas. Espora central o terminal, no capsulado. Móvil. Gram positivo.

Cultivo positivo después de media hora en ebullición.

Inoculación.—Un centímetro cúbico de cultivo de veinticuatro horas por vía intraperitoneal mata al ratón.

Considerado como célula rígida, sin micelio, pertenece al orden de las *Eubacteriales* y al suborden de las *Eubacterineae*. Por poseer endosporas es de la familia de las *Bacillaceae*, y ser aerobio es del género *Bacillus*. Por las características anteriormente mencionadas, podemos suponer se trata del *Bacillus subtilis*.

Observaciones.—Se ha comprobado que crece mucho mejor y más abundante con caldo preparado a partir de la maceración de espárragos.

Cultivo B.

Aerobio. Temperatura, 37°; óptima, 25°; pH, algo alcalino.
Agar placa.—Colonias amarillas elevadas de superficie brillante.
Agar inclinado.—Cultivo liso, amarillo y húmedo.
Patata.—Colonias secas y mates.
Gelatina.—Licuefacción infundibuliforme.
Caldo.—Sedimento amarillo abundante; no hay turbidez.
Vogues-Proskauer.—Positivo.
Reducción nitratos a nitritos.—Positiva.
Fermentación y acidez.—No fermenta los azúcares.

Morfología.—Micrococo dispuesto en grupos o en tétradas. Gram positivo. Sin esporas.

Todos estos caracteres hacen presuponer se trata de *Sarcina lútea.*

Cultivo C.

Aerobio. Temperatura, 37°; pH = 7,4.

Agar placa.—Colonias lisas, amarillas, de bordes enteros y brillantes.

Agar inclinado.—Cultivo abundante, amarillo, opaco, liso y confluente.

Patata.—Germinación pobre, amarillenta a las veinticuatro horas.

Gelatina.—Licúa la gelatina en forma de saco.

Caldo.—Turbidez y sedimento; el pigmento en medio líquido no difunde.

Voges-Proskauer.—Positivo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Positivo.

Indol.—Negativo.

Fermentación y acidez.

Xilosa:	— +	Lactosa:	— +	Glicerina:	— +
Glucosa:	— +	Sacarosa:	— +	Manitol:	— +
Galactosa:	— +	Maltosa:	— +		
Ramnosa:	— +	Rafinosa:	— —		

Agar sangre.—Buen desarrollo, hemólisis alrededor de las colonias.

Morfología.—Micrococo Gram positivo, agrupado en racimos. Inmóvil sin esporas.

Debido a estas características, se supone se trata del *Staphylococcus aureus.*

Cultivo C_1.

Cultivo de características parecidas al anterior, pero sin formación de pigmento; la licuación de la gelatina no es tan constante y su patogeneidad, investigada por inoculación en conejo, no es fatal.

Se supone se trata del *Staphylococcus albus.*

Observaciones.—Un cultivo parecido al C_1, blanco como él, pero hemolítico y que coagula los medios con plasma, ha sido inoculado a un

conejo, viéndose una alta patogeneidad. Hemos observado cocos en la sangre y hemorragias internas. Esta toxicidad nos hace suponer que se trata de variante blancas del *Staphylococcus pyogenes.*

Cultivo C_2.

Hemos obtenido un cultivo de idénticas características que el C. Se diferencia de éste por una pigmentación más amarilla limón, poca licuación de la gelatina, fermenta la rafinosa con producción de acidez y nula para los demás azúcares. Es también hemolítico y patógeno.

Se podrá suponer que es el *Staphylococcus citreus.*

Anotaciones.—Para el cultivo de estos *Staphylococcus* se ha empleado el medio de Chapman, compuesto de agar hipertónico, manitol y rojo fenol, medio específico para ellos; hemos apreciado, en caso de *Staphylococcus* patógenos, un buen desarrollo y decoloración del medio.

Cultivos D.

Agar placa.—Colonias pequeñas de aspecto variable.

Agar inclinado.—Desarrollo relativamente escaso.

Gelatina.—Licuación negativa.

Caldo.—Escaso enturbiamiento, sedimento, sin película.

Agar sangre.—Gran poder hemolítico para el D_1 débil para el D_3 y casi nulo para el D_2.

Fermentación y acidez.

Xilosa:	— +	Lactosa:	— +	Glicerina:	— —
Glucosa:	— +	Sacarosa:	— +	Manitol:	— —
Galactosa:	— +	Maltosa:	— +		
Ramnosa:	— —	Rafinosa:	— —		

Voges-Proskauer.—Negativo.

Indol.—Negativo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Negativa.

Morfología.—Micrococcus en cadenas o aislados, Gram positivo sin esporas e inmóvil.

Estos son los caracteres del cultivo que se supone es de *Streptococcus pyogenes.*

La inoculación en ratón ha dado resultados letales.

DIFERENCIAS.—Los cultivos llamados D_2 y D_3 se han cultivado en medio normal añadido de un 5 por 100 de rafinosa, acusando una muy baja acidez final en el primero, menor en el segundo y coagulación de ambos en la leche.

Se podrían clasificar *Streptococcus* de los tipos *salivarius* y *mitis*.

Cultivo E

Aerobio. Temperatura, 37°; pH = 7,3.

Agar placa.—Colonias redondas, blancas, brillantes, convexas y lisas.

Agar inclinado.—Desarrollo abundante, blanco.

Patata. Desarrollo amarillento confluente y mucoide, a veces hay formación de un pigmento parduzco.

Gelatina.—No hay licuación, pero sí crecimiento en forma de clavo.

Caldo.—Turbidez y velo superficial.

Fermentación y acidez

Xilosa:	+ +	Lactosa:	+ +	Glicerina:	+ +
Glucosa:	+ +	Sacarosa:	+ +	Manitol:	+ +
Galactosa:	+ +	Maltosa:	+ +		

Voges-Proskauer. — +.

Indol. — +.

Reducción de nitratos a nitritos.—Positiva.

Leche tornasolada.—Acidez y cuajo.

Poder hemolítico en agar sangre.—Nulo.

Morfología.—Bacilo de extremos redondeados aislado o a veces en parejas, Gram negativo, capsulado en los cultivos.

Inoculación.—Inoculado un ratón intraperitonealmente, muere a las veinticuatro horas: hemos encontrado bacilos capsulados en la sangre y bazo.

Siguiendo la sistemática del «Bergey's», se cree puede clasificarse como el *Pneumobacilo de Friedländer.*

OBSERVACIONES.—Hemos obtenido un cultivo abundante en medio con citrato sódico.

Cultivo F.

Este cultivo es bastante semejante al anterior. Hemos creído, por las características que más abajo detallaremos, que lo podríamos clasificar como *Escherichia coli;* y decimos que es bastante semejante al anterior porque ambos géneros pertenecen a la tribu de las *Escherichiae.*

Su principal diferencia es que no es capsulado, pero como en cultivos el pneumobacilo tampoco lo es, de ahí que vamos a enumerar las diferencias entre ambos.

Agar placa.—Colonias circulares, brillantes y pequeñas. Este medio añadido con citrato sódico no permite desarrollo alguno; el medio específico para dicho germen es el medio Endo.

Agar inclinado.—Desarrollo muy extendido, blanco y húmedo.

Patata.—Poco desarrollo, adquiriendo un color amarillo pálido.

Caldo.—Turbidez, sedimento escaso y sin película.

Gelatina.—No se licúa.

Fermentación y acidez.

Xilosa:	+ +	Lactosa:	+ +	Glicerina:	+ +
Glucosa:	+ +	Sacarosa:	± ±	Manitol:	∓ ∓
Galactosa:	+ +	Maltosa:	+ +		
Ramnosa:	+ +	Rafinosa:	± ±		

Voger-Proskauer.—Negativo.

Indol.—Positivo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Positivo.

Morfología.—Bacilo corto, sin cápsula, Gram negativo. En algunos se han visto flagelos perítricos y, en cambio, otros son inmóviles.

Observaciones.—Se ha sembrado en medio Taeque-Levine, y a las veinticuatro horas se han desarrollado colonias metálicas, colonias azules y rosadas. Hemos hecho, a partir de estas colonias, siembras en medios diferenciales: agua de peptona, glucosa Clark, caldo lactosa, caldo sacarosa, Koser al citrato, Koser al ácido úrico, agar Simmons, para saber si se trataba de *coli* fecal o *aerogenes.*

Los resultados que hemos obtenido han sido que, partiendo de colonias en agar, más lisas y más convexas y algo mucoides (las cuales han crecido en medio agar corriente), las hemos podido clasificar como pertenecientes a *B. coli aerogenes.*

Cultivo G.

Por su morfología, movilidad y el olor putrefacto de sus cultivos, nos ha sido bastante fácil poder clasificar este germen. Su descriptiva es: Aerobio: — +. Temperatura, 37°, pero buen desarrollo a los 20°. *Agar placa:* Cultivo muy extendido.

Agar inclinado.—Enorme pululación de los gérmenes debido al agua de condensación.

Patata.—Después de cuatro o cinco días, germinación elevada; hay aparición de un pigmento color parduzco.

Gelatina.—Rápida licuación.

Caldo.—Desarrollo moderado y escasa turbidez; olor pútrido.

Agar sangre.—Desarrollo uniforme, la sangre se vuelve traslúcida, pasando a color pardo.

Fermentación y acidez.

Glucosa:	+ +	Lactosa:	— —	Glicerina:	+ +
Galactosa:	+ +	Sacarosa:	+ +	Manitol:	— —
		Maltosa:	± ±		

Vöges-Proskauer.—Negativo.

Indol.—Positivo.

SH_2: Muy positivo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Positiva.

Morfología.—Bacilos agrupados ya por parejas, ya en cadenas, Gram negativo. Móvil debido a flagelos perítricos. Inmóvil a 37°, pero móvil a los 25°.

Inoculación.—Hemos inyectado subcutáneamente a un cobayo y hemos podido observar abscesos y procesos inflamatorios que duran varios meses. Se supone se trata de *Proteus vulgaris.*

Anotaciones.—Es inhibido en medio con citrato sódico.

Cultivos H-I.

Germen aerobio, capaz de cultivar anaeróbicamente, temperatura 37°.

Agar placa.—Crecimiento poco abundante, colonias muy pequeñas, convexas.

Agar inclinado.—Crecimiento escaso.

Gelatina.—No la licúa. Crecimiento en forma de clavo.

Patata.—Desarrollo muy escaso, debido a la temperatura baja.

Caldo.—Ligera turbidez.

Todos los medios anteriores han sido sembrados con el cultivo obtenido en agar sangre telurito. En él se han formado colonias convexas de borde continuo y algo grisáceas.

Fermentación y acidez.—No hay producción alguna de gas, pero sí acidez en la glucosa, maltosa, galactosa; es negativa para la lactosa, sacarosa y manitol.

Indol.—Negativo.

Voges-Proskauer.—Negativo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Positiva.

Morfología.—Formas bacilares dispuestas en empalizada, Gram positivo. Inmóvil. No esporógeno. Se aprecian también granulaciones metacromáticas.

Por todo ello se ha creído justo suponerlo un *Corynebacterium diphtheriae.*

Observaciones.—Hemos cultivado en medio Loeffler, obteniendo un buen crecimiento; inoculado en cobayo subcutáneamente, ha aparecido en el punto de inoculación una tumefacción. Sólo en un caso el cobayo ha muerto a los cuatro días de ser inoculado. En su autopsia se han visto los ganglios linfáticos infartados, vísceras intestinales congestionadas, hipertrofia de las cápsulas suprarrenales y un exudado en la cavidad pleural. En las demás inoculaciones sólo se ha visto un edema local como única manifestación, lo que nos lleva esto a suponer que el cultivo fuera de *Corynebacterium pseudodiphtherico.*

Por otra parte, hemos hecho pruebas de fermentación de dextrina, almidón y glicol. Los resultados han sido negativos para los dos últimos, lo que nos lleva a descartar la posible clasificación como tipo *gravis.*

Cultivo J.

Aerobio. Temperatura, 37°.

Agar sangre.—Colonias con superficie aplanada y lisa, a veces con débil hemolisis; bordes de colonias elevados formando un anillo.

Agar placa.—Colonias pequeñas y escasas.

Patata.—Desarrollo nulo.

Gelatina.—No licúa y desarrollo mínimo.

Caldo.—Turbidez y depósito, sin película.

Indol.—Negativo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Negativa.

Fermentación y acidez.—No hay producción de gas en lactosa, glucosa, maltosa y rafinosa. No fermenta el manitol.

Leche tornasolada.—Acidificación y cuajo.

Morfología.—Gram positivo en forma de cocos agrupados por pares y capsulados. La presencia de la cápsula ha sido puesta de manifiesto por la tinción con tinta china. Es un germen inmóvil.

Inoculación.—Hemos inoculado un centímetro cúbico de suspensión en suero fisiológico estéril de un cultivo en ratón por vía subcutánea, determinándose una septicemia a las veinticuatro horas. Muerto el animal, hemos practicado la autopsia, recogiendo con pipeta Pasteur estéril sangre del corazón del animal, que se ha sembrado en el medio adecuado, obteniéndose así un cultivo puro de *Diplococcus pneumoniae.*

No hemos podido obtener ningún resultado positivo para clasificar el tipo de pneomococo por la seroaglutinación frente a los diversos sueros tipo; no ha habido ningún hinchamiento de la cápsula.

Cultivos K.

Estudio de la posible existencia de gérmenes ácido alcohol resistentes en el macerado del papel moneda.

Se han tenido que efectuar ciertas operaciones de selección para obtener un probable cultivo de los mismos.

a) Se ha tratado un volumen del filtrado con 5 c. c. de una solución de penicilina de 5.000 U. O., a fin de eliminar la flora asociada.

b) Hemos tratado una parte del líquido filtrado obtenido de la ma-

ceración del billete de peseta con ácido sulfúrico al 10 por 100 con el mismo propósito.

c) A un volumen del filtrado se le ha añadido antiformina para facilitar el desarrollo aislado de los gérmenes ácido alcohol resistentes.

Se han centrifugado las soluciones *b)* y *c)*: se han lavado y el sedimento obtenido ha sido considerado por nosotros, junto con la suspensión *a)*, como punto de partida para la siembra en medios específicos para estos gérmenes.

Resultados.

Patata glicerinada.—Hemos obtenido, por un lado, unos cultivos rugosos, con superficie granulosa y pigmentación, que pasa de amarillo al naranja. Por otro lado, se han obtenido cultivos apigmentados.

Medio Lowenstein.—Unos tubos con cultivo rápido, abundante, liso y de consistencia cremosa; éstos han dado en caldo glicerinado una débil película. Otros tubos han tenido un desarrollo tardío, más allá de los cuarenta días.

Tinciones.—Hemos teñido por método Ziehl-Nielsen los cultivos pigmentados de patata glicerinada, y no hemos observado ningún germen de este tipo, lo que indicará que son débilmente ácido alcohol resistentes.

De los cultivos apigmentados hemos obtenido tinciones en las que se ha visto la presencia de estos gérmenes.

Por el método de la triple coloración hemos visto en las preparaciones de los cultivos mencionados en primer lugar unos bacilos de color azul; en cambio, en los segundos cultivos se han visto bacilos de color rojo.

También hemos teñido las preparaciones procedentes de las dos clases de cultivos con rhodamina B y auramina 00 para observarlas al microscopio de fluorescencia.

En el primer caso se han visto bacilos de color verde, lo que confirma la débil ácido-alcohol resistencia.

En el segundo caso hemos visto bacilos de coloración francamente anaranjada.

He aquí hemos concluído la casi segura existencia de *Mycobacterium* tuberculosos patógenos y saprofitos.

Para diferenciarlos mejor hemos extremado otras pruebas.

1. *Resistencia al P. A. S.*—En medio Dubos los virulentos son inhi-

bidos por una gamma por centímetro cúbico de dicho fármaco; en cambio, los saprofitos necesitan del orden de las 1.000 gammas.

2. *Reacción del rojo neutro.*—Los gérmenes son emulsionados por dos veces con alcohol metílico al 50 por 100. El sedimento se suspende en solución acuosa de pH = 8,3, añadiendo una gota de rojo de metilo. Se centrifuga. Si el sedimento es de color rojo ladrillo, es que se trata de gérmenes virulentos; si es amarillo, son paratuberculosos avirulentos.

3. *Reacción del azul de metileno.*—Los bacilos tuberculosos virulentos no lo decoloran: en cambio, lo hacen rápidamente los no virulentos.

4. *Fluorescencia a la luz ultravioleta.*—Sólo la dan los virulentos.

5. *Inoculación en animales.*—Hemos inoculado dos lotes de cobayos. El primero con la emulsión del cultivo por vía subcutánea, otro por vía intraperitoneal y otro por vía submamaria, en suspensión en 2 c. c. de aceite de parafina. En el primer lote, cuya suspensión era de gérmenes saprofitos, los resultados obtenidos por las tres vías anteriormente descritas han sido: 1.º, lesión local sin evolución; 2.º, muerte a los quince días con hipertrofia del bazo; y 3.º, infarto de los ganglios linfáticos, son pruebas que demuestran claramente la presencia de los bacilos ácido-alcohol resistentes saprofitos.

En cambio, en el segundo lote hemos observado: 1.º, la inoculación por vía S. C. ha dado lugar a la aparición, a los veinte días, de una adenopatía inguinal con chancro, adelgazamiento y muerte del animal. Da la intradermo reacción a la tuberculina positiva. En la autopsia se ven las lesiones caseosas típicas, y en los frotis de los ganglios se han creído observar bacilos Ziehl-Nielsen positivos; 2.º, la inoculación por vía I. P. ha dado lugar a una peritonitis al cabo de un mes. Los resultados de la autopsia son característicos de la tuberculosis: 3.º, por vía submamaria da lugar a la aparición de los ganglios característicos, siguiendo los síntomas naturales de esta enfermedad. Todo ello nos ha llevado a la conclusión de la existencia de gérmenes ácido-alcohol resistentes causantes de la enfermedad tuberculosa.

Cultivo L.

Como apuntamos ya en un principio, la cualidad de las bacterias existentes en el papel moneda, puesta de manifiesto por el análisis correspondiente, nos ha permitido sospechar la última procedencia del billete. Vamos ahora a detallar las características de dos gérmenes hallados en

unos billetes, que posteriormente se nos confirmó procedían de una pescadería de un mercado.

Aerobio. Temperatura óptima, 30° o inferior.

Agar placa.—Colonias pequeñas, que adquieren fosforescencia.

Agar inclinado.—Crecimiento muy viscoso que adquiere fosforescencia a los cuatro o cinco días.

Patata.—En capa blanca delgada.

Gelatina.—Licuación. Adquiere fosforescencia verde.

Caldo (alcalino).—Turbidez a las veinticuatro horas, con formación de película.

Caldo (ácido).—No hay turbidez ni fosforescencia.

Morfología.—Bacilo móvil sin cápsula, grueso y Gram negativo.

Todo ello nos ha llevado a la casi seguridad de tratarse de *Pseudomonas phosphorescens.*

Cultivo Ll.

Este cultivo es otro ejemplo de lo expuesto en las páginas anteriores.

Agar placa.—Colonias opacas, blancas pasando a rojo.

Agar inclinado.—Colonias separadas rojizas.

Patata.—Crecimiento con producción de pigmento rojo, a 37°.

Caldo.—Turbidez, película, pasando todo a color rojo.

Gelatina.—Licuación y producción de pigmento.

Reducción de nitratos a nitritos.—Positiva.

Fermentación de glucosa con producción de gas.

Coagula la leche.

Morfología.—Gram negativo, bacilos cortos, a veces en parejas o en número de cuatro. También se presentan formando largos filamentos.

Tiene un olor característico, que se ha podido reconocer como el de trimetilamina.

Conocidas todas estas características, las hemos trasladado al «Bergey's», y creemos poder clasificarlo como bacilo *Piscatorus* o *Bacillus sardinae.*

CULTIVO DE GERMENES ANAEROBIOS

Para lograr el desarrollo de estos posibles gérmenes se han hecho siembras en medios específicos para ellos. Así, se han usado los medios

de Wilson-Blair, Brewer, Robertson, sembrando en tubos de ensayo de diámetro reducido y taponando con vaselina líquida estéril.

Cultivo 1.

Anaerobio estricto. Temperatura, 37°, y pH = 7.

Siembra profunda en agar; a los cuatro días el medio se rompe por varios puntos, dando colonias en el medio menos en la superficie.

Gelatina.—Poca licuación y pigmentación negruzca.

Caldo.—Débil turbidez y sedimento granuloso.

Agar sangre.—Hemolisis.

Las esporas resisten a la ebullición durante una hora.

Voges-Proskauer.—Negativo.

Indol.—Positivo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Negativa.

Fermentación.—Fermenta con producción de gas, glucosa y maltosa, y débilmente la arabinosa, galactosa, lactosa y sacarosa.

Morfología.—Forma bastonada, recta y fina, sin cápsula, móvil, espora esférica y terminal. Gram positivo.

Inoculación.—Por inyección subcutánea de un centímetro cúbico de cultivo en caldo hemos visto la muerte del cobayo a las cuarenta y ocho horas, con sintomatología característica del tétanos, sin septicemia.

Todo ello nos lleva a la conclusión de suponer se trata de *Clostridium tetani.*

Cultivo 1_1.

Anaerobio. Temperatura, 37°.

Agar.—En siembra profunda da colonias irregularmente redondas.

Wilson-Blair.—Da colonias negras debido a la reducción del sulfito sódico.

Gelatina.—Licuación.

Caldo.—Enturbiamiento escaso y sedimento pulverulento. Olor pútrido.

Igual ocurre en medio de Robertson.

Voges-Proskauer.—Negativo.

Reducción de nitratos a nitritos.—Negativa.

Leche tornasolada.—Coagulación y digestión de la misma.

Fermentación y acidez.—Fermentación de la glucosa y maltosa, manosa, levulosa, galactosa y glicerina.

Morfología.—Forma bacilar recta, con esporas y sin cápsula. Espora oval y subterminal, móvil y Gram positivo.

Nos hemos basado en esta descriptiva, para suponer se trata de un *Clostridium sporogenes.*

ESTUDIO DE ACTINOMYCES

De las siembras en agar común, se han aislado unas colonias de aspecto cremoso, adheridas al medio, y que observadas con lupa distinguíamos perfectamente una superficie radiada. Hemos hecho unos exámenes al fresco, en los cuales hemos visto formas micelares ramificadas que se fragmentan en cocos o bacilos.

En medio líquido hemos visto formación de una película en la parte superior del tubo y de superficie arrugada.

En medio sólido se aprecian pigmentaciones de color blanco, verde, amarillo, las cuales nos facilitarán nuestro intento de clasificación.

Son, pues, bacterias fungáceas, de la familia de las Actinomicetáceas, en cuyos géneros *Streptomyces, Actimomyces, Nocardia*, a pesar de la disparidad de opiniones clasificatorias, hemos querido describir.

Cultivo a.

Aerobio. Temperatura, de 20 a 37°; pigmentación amarillenta anaranjada. Agar a temperatura de 22°. Colonias redondas, aplanadas y opacas, con superficie nodulosa y bordes festoneados.

Agar inclinado.—Desarrollo abundante, de aspecto farináceo.

Patata.—Poco desarrollo blanquecino que pasa a amarillo naranja.

Caldo.—Sedimento membranoso con débil película en superficie. A los siete días hemos visto un engrosamiento de la película con puntos anaranjados.

Voges-Proskauer.—Negativo.

Indol.—Negativo.

Reducción de nitritos a nitratos.—Positiva.

Fermentación y acidez.—Negativa; sin embargo, la adición de azúcares en el medio favorece el desarrollo.

Con enormes salvedades por nuestra parte lo podríamos clasificar como *Actinomyces graminis*, siguiendo ahora la descriptiva de «Topley».

Cultivo b.

Este cultivo lo hemos clasificado como debido al desarrollo de la *Nocardia termofila* o *Streptomyces termofilus*.

Se han visto unas hifas rectas y formación de conidios. En medio Czapek se ve un crecimiento incoloro, con un pequeño micelio aéreo, sobre patata da lugar a un crecimiento amarillento. En agar o gelatina no produce pigmento; sin embargo, licúa a ésta. Su temperatura óptima es de 50° y es aerobio.

HONGOS

Por último, vamos a dedicar un breve comentario a los resultados que hemos obtenido en el cultivo y desarrollo de hongos.

Para ello hemos sembrado en medios diferenciales de éstos para observar los diversos crecimientos a distintas temperaturas.

Medios usados.—Agar caldo común, medios Sabouraud sólido y líquido, Czapek y medios nutritivos a base de agar añadidos con unos azúcares determinados; ejemplo: agar con 50 por 100 de glucosa y 5 por 100 de ácido tartárico.

Estos medios, por tener un pH muy bajo, impiden el crecimiento de numerosas bacterias; son ya, pues, medios selectivos.

Cultivo 1.

Medio Sabouraud.—Se ha desarrollado un hongo de apariencia filamentosa, blanco y con conidios negros.

Observado al microscopio, se ha visto su micelio tabicado, la formación de ascosporas, por lo que pertenece al grupo de los Ascomicetos.

Los conidios están dispuestos en largas cadenas, y mediante unos tallos pequeños se unen a los conidióforos.

Pertenece, pues, al género *Aspergillus* (como que cultiva bien a 37°; esto apoya más nuestra opinión); por el color negro y forma redonda los conidios, podría ser el *Aspergillus niger*.

Cultivo 2.

Examinando microscópicamente las preparaciones obtenidas a partir de cultivos efectuados en medio Czapek y Sabouraud, hemos podido ver unas células filamentosas y otras en forma como de levaduras.

Crece a pH bajos, pero bien a pH neutro.

Para ver mejor su morfología, hemos preparado en portas una partícula de micelio, a la cual hemos añadido una gota de alcohol del 95 por 100, y luego una gota de hidróxido sódico al 10 por 100. Se dispone un cubre encima; con ello hemos logrado una más perfecta visión de la pared celular y otros detalles morfológicos.

Agar glucosado inclinado.—Crecimiento, blanco cremoso y de consistencia pastosa.

Gelatina.—En la parte superior de la punción aparecen colonias de apariencia mantecosa, compuestas totalmente por cédulas levaduriformes; después de unos pocos días hay crecimiento en forma de clavo, formándose radiaciones en ángulo recto semejando un abeto.

En medio líquido el crecimiento es en la parte inferior.

Hemos notado que cuando las condiciones eran favorables (medio nutritivo, abundante aireación) predominaban las formas de levadura.

Fermenta la glucosa, maltosa, rafinosa y no la sacarosa.

En la observación microscópica, después de aclarar con hidróxido sódico, hemos visto masas de filamentos divididos con micelios segmentados.

Inoculación.—Ha producido en ratón abscesos localizados en músculo cardíaco y del riñón; también se ha presentado una infección generalizada.

Gracias a todas estas características, hemos creído se trata de un hongo del género *Candida*, y dentro de éste la especie *Candida albicans*.

ANALISIS CUANTITATIVO DEL PAPEL MONEDA

En esta segunda parte del trabajo presentaremos los resultados cuantitativos obtenidos en las siembras que hemos efectuado para dicha finalidad.

Los resultados numéricos que exponemos seguidamente son el valor medio de los muchos que hemos hallado.

Consideraremos esta cuestión desde dos puntos de vista; el primero se refiere a los resultados obtenidos en las siembras a partir de suspensiones del billete macerado después de veinticuatro horas. Con ello hemos logrado una concentración en el número de gérmenes; por lo tanto, los resultados serán mayores. El segundo se refiere a las siembras que hemos hecho a partir del papel moneda en suspensión en suero fisiológico estéril, sin maceración, a 37° en estufa y durante veinticuatro horas. Los resultados aquí están muy disminuídos.

Las gráficas que exponemos en las páginas siguientes muestran esta desproporción; asimismo también lo ilustran las fotografías que posteriormente siguen.

Como es fácil comprender, hemos hallado enormes diferencias cuantitativas según el estado de los billetes que nos han servido para su análisis, y también según el valor monetario de los mismos.

Expresamos los resultados de la siguiente forma:

I. Resultados obtenidos a partir de la trituración, suspensión en suero fisiológico:

a) Con maceración en estufa a 37° durante veinticuatro horas.

b) Sin maceración.

Dichos resultados son los que hemos obtenido a partir de billetes de una, cinco, veinticinco y cincuentas pesetas.

Con los billetes de cien, quinientas y mil pesetas se ha empleado la técnica siguiente:

Humedecemos dichos billetes con suero fisiológico estéril y se disponen sobre placa de agar, procurando no dejar aire alguno entre éste y el billete. Así, después del desarrollo en agar y otros medios de cultivo, los billetes han podido ser recuperados.

II. Resultados obtenidos a partir del lavado de monedas metálicas, en suero fisiológico.

a) Con maceración en estufa a 37° durante veinticuatro horas.

b) Sin maceración.

III. Estudio comparativo de los resultados anteriores, en el que aportamos gráficas y fotografías.

Diluciones.

Las diluciones empleadas han sido desde 1/10 hasta 1/25000000, dependiendo del estado o valor del billete que hayamos extremado más o menos.

Los resultados obtenidos los hemos expresado por unidad monetaria, o sea billete papel o moneda metálica total, y por centímetro cuadrado de superficie cuando los resultados se referían a moneda papel. Aquí hemos de tener en cuenta la técnica empleada, ya que si los resultados se refieren a los obtenidos con billetes triturados y en suspensión, intervendrán en la superficie total las dos caras del billete; en cambio, los resultados obtenidos a partir de billetes sembrados por extensión, en el cálculo de su superficie sólo intervendrán la cara que contacta con el medio de cultivo.

I

a)

Hemos tomado un billete de peseta, el cual lo hemos troceado y macerado en un mortero estéril con 10 c. c. de solución fisiológica estéril. O sea, la solución madre es al 1/10. Se deja incubar en estufa a 37° durante veinticuatro horas.

Al cabo de este tiempo hacemos diluciones con solución fisiológica estéril, operando en las máximas condiciones de esterilidad.

Las diluciones que hemos hecho son:

1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 1/25000000.

Sembramos un centímetro cúbico de cada una de ellas en diferentes placas Petri y por homogeneización. Las llevamos a la estufa a 37° durante veinticuatro horas.

Al día siguiente procedemos a la lectura del número de colonias desarrollado, obteniéndose los siguientes resultados:

En las primeras diluciones el crecimiento ha sido en sábana y, por tanto, imposible de contar.

En la tercera dilución ha habido un gran desarrollo y su cálculo es fácilmente erróneo.

En la cuarta dilución los resultados han sido: en tres placas cualquiera de los muchos análisis repetidos: 435, 458, 475, lo que viene a representar un valor medio de 456 colonias por campo, o sea 1.824 por placa, lo que por centímetro cúbico representa 1.824 millones y por peseta entera 18.240 millones. Expresando en centímetros cuadrados, ya que la superfice total del billete es de ($6 \times 8 \times 2 = 96$ cm²), nos da 190 millones por centímetro cuadrado.

En la quinta dilución—1/25.000.000—hemos obtenido los resultados que siguen: 18, 21, 15 colonias por cada uno de los campos, o sea 18 por campo y medio y por placa: 72 colonias.

Multiplicando por la dilución correspondiente, da 1.800 millones por centímetro cúbico, 18.000 millones por billete entero y 187.500.000 por centímetro cuadrado.

Billetes de 5 pesetas.—Los resultados obtenidos a las distintas diluciones han sido:

1/1.000.000: 980, 975, 985, en cada una de las tres placas, o sea un valor medio de 980 colonias por placa, y de 980 millones por centímetro cúbico y 9.800 millones por billete total: o también 74 millones por centímetro cuadrado.

1/100.000: obtenemos los resultados de 968 millones por centímetro cúbico; 9.680 millones el billete entero: 73 millones por centímetro cuadrado.

Los resultados obtenidos a las distintas diluciones no difieren mucho entre sí.

Billetes de 25 pesetas.—Los datos de valor medio que hemos obtenido han sido: 1/1.000.000: 17 colonias por placa, lo que representa 17 millones por centímetro cúbico; 170 millones por billete entero y 850.000 por centímetro cuadrado.

1/100.000: 165 colonias por placa: 16.500.000 por centímetro cúbico: 165 millones por billete entero; 910.000 por centímetro cuadrado.

Billetes de 50 pesetas.—Para las suspensiones de los billetes de 50 pesetas se parte de solución madre al 1/20, por lo que las cifras obtenidas a las mismas diluciones anteriores han de ser multiplicadas por 20 y no por 10, como hasta ahora veníamos haciendo. La razón es obvia: el billete de mayor tamaño necesita mayor volumen de líquido; en este caso suero fisiológico estéril para su maceración.

1/100.000: placas con 64, 68, 60, colonias contadas, lo que significa

600.000 por centímetro cúbico y 128 millones por billete entero, y 500.000 por centímetro cuadrado.

1/10.000: placas con 670, 650, 690 colonias contadas, o sea 6.700.000 por centímetro cúbico; 134 millones el billete total; 580.000 por centímetro cuadrado, ya que la superficie del mismo es de 13,5 × 8,5 × 2 = 229,5.

Billetes de 100 pesetas.—La técnica es diferente; aquí no intervienen diluciones y sólo hay que contar con una cara en el cálculo de su superficie. Esta es de 14 × 9 = 126 centímetros cuadrados.

El número de gérmenes totales hallados es de 73 millones, y de 570.000 por centímetro cuadrado.

Billetes de 500 pesetas.—La superficie de éste es de 14,7 × 9,7 = 142,6 centímetros cuadrados. El número total de gérmenes hallado, y por una sola cara, es de 24 millones, lo que representa 168.000 por centímetro cuadrado.

Billetes de 1.000 pesetas.—El número de gérmenes que hemos contado a partir del cultivo por extensión de una cara de este billete es de 18 millones. Su superficie es de 15,8 × 10,3 = 162,7, lo que viene a significar 110.000 gérmenes por centímetro cuadrado.

b)

Resultados hallados con diluciones procedentes de la trituración seguida de la siembra, sin maceración en estufa a 37° y durante veinticuatro horas.

Se ha procedido igual en idénticas condiciones y manipulaciones.

Billete de 1 peseta.—Frente a los 18.000 millones de gérmenes por billete en el primer caso, aquí hemos encontrado 800 millones.

Billete de 5 pesetas.—El número de gérmenes hallado aquí es de 500 millones frente a los 9.800 millones del primer caso.

Billete de 25 pesetas.—Frente a los 170 millones encontrados en las primeras condiciones, aquí hemos contado 81 millones.

Billete de 50 pesetas.—Aquí la diferencia entre uno y otro caso es de 64 millones frente a 128 millones.

II

En vista de los resultados obtenidos expuestos anteriormente, hemos

creído interesante el estudio del análisis y control de monedas metálicas de curso legal, en la misma forma que hemos operado antes. El objeto de este estudio es poder comparar ambos resultados.

La técnica seguida es la siguiente:

a) Siembra de los líquidos procedentes del lavado de las monedas con suero fisiológico estéril.

b) Siembra de los líquidos procedente de la incubación durante veinticuatro horas en estufa a 37° de las mismas monedas en suero fisiológico estéril.

Los resultados que hemos obtenido y que a continuación exponemos son los hallados tanto directa como comparativamente con el papel moneda.

a)

En la siembra de un centímetro cúbico del líquido de lavado, sin dilución alguna hemos contado para *una peseta metálica* 70 millones.

Moneda de 5 pesetas.—El número total de gérmenes hallado después de la siembra de un centímetro cúbico de los líquidos procedentes del lavado ha sido de 130 millones.

b)

Operando de la misma manera, pero después de veinticuatro horas de incubación, los resultados que hemos obtenido son:

Moneda de 1 peseta.—Número total de gérmenes, 110 millones.

Moneda de 5 pesetas.—280 millones de gérmenes.

En vista de los resultados obtenidos, y con el convencimiento de que esta disminución en el número de gérmenes hallado es debido a la acción oligodinámica ejercida por los diferentes metales que entran en su fabricación, creímos también oportuno hacer el estudio tanto en las monedas de curso legal como con las anteriores a éstas, por entrar fundamentalmente en su aleación la plata, que, junto con los metales nobles Au, Cu, son, como ya es sabido, los que mayor acción oligodinámica tienen.

Veamos seguidamente las gráficas y fotografías comparativas del análisis del papel moneda y moneda metálica.

MONEDA EXTRANJERA

Asimismo, aunque no hemos creído necesario acompañar las fotografías demostrativas de los resultados con monedas de circulación vigente en otros países, hemos hecho su estudio, siendo principalmente monedas de Alemania, Dinamarca, Francia, Inglaterra, Italia, Marruecos francés y Portugal. Y es debido a que los resultados que hemos obtenido no son de un número suficiente de investigaciones, por la escasa cantidad que de estas divisas disponíamos. Además de que por el tiempo que hace las obtuvimos, las últimas en los años 1946, 47, 49, no iban a ser fiel reflejo de moneda en plena circulación. Pues lo que era lógico suponer era que durante este tiempo se habrían destruído gran número de especies bacterianas por la acción oligodinámica de sus componentes: también obtendríamos un crecimiento distinto del real de la flora bacteriana del país de procedencia, aunque, en vista de los resultados obtenidos, ésta es análoga a la existente en las monedas estudiadas en nuestro país.

Las técnicas seguidas para este fin son:

1. Siembra directa en agar placa de monedas de curso legal y de plata.

Los resultados obtenidos son: buen desarrollo alrededor de las monedas de 0,50, 1, 2,50, 5 pesetas de curso vigente, y nulo alrededor de las monedas de 0,50, 1, 5 pesetas de plata.

2. Siembra en agar placa de los dos juegos anteriores de monedas, previo lavado y desengrasado con alcohol éter. Se tratan luego con clorhídrico y se vuelven a lavar. Luego se esterilizan. El agar—medio de cultivo—ha sido previamente sembrado homogéneamente con suspensión de un billete de peseta. Los resultados obtenidos son: cultivo homogéneo alrededor de las monedas de curso legal y halo inhibitorio de crecimiento alrededor de las monedas de plata.

3. En placas agar de tamaño corriente, hemos comparado los halos de inhibición o la ausencia de los mismos, según se trate de monedas de curso legal o de plata, pero de igual valor monetario.

No queremos dejar de repetir lo que al principio hemos mencionado de nuestra observación sobre la acción oligodinámica que ejercen las tiras metálicas incluídas en los billetes de 100 pesetas de la emisión de 2 de mayo de 1948.

El hecho ha sido observado, como habíamos indicado, gracias a la acción inhibitoria del crecimiento en las placas de cultivo que por extensión de los referidos billetes habíamos hecho. Lo hemos podido observar casi constantemente (y decimos casi constantemente, porque en alguno de ellos, debido a su estado, no ha sido claramente vista) y mediante el microscopio estereoscópico.

En efecto, en el medio de cultivo se comprueba la inhibición o nulo desarrollo de colonias en zonas correspondientes a la inclusión de la tira metálica de los referidos billetes. (La técnica por nosotros seguida es la ya explicada anteriormente, es decir, por extensión del billete previo humedecimiento del mismo.)

También se han hecho pruebas de esta acción oligodinámica con polvos de Ag y tiras de Cu, viéndose zonas de nulo crecimiento alrededor de dichos metales.

Nosotros creemos que esta acción oligodinámica puede ser debida a la acción tóxica de los iones Ag, que, procedentes de la moneda, difunden en el medio de cultivo e impide el desarrollo de los gérmenes.

CONCLUSIONES

1.ª Creemos de gran interés, a la vista de los resultados obtenidos, que debería de establecerse la obligatoriedad del control analítico bacteriológico periódico del papel moneda, sirviendo estos resultados como asesoramiento para la retirada de la circulación del mismo.

2.ª El interés que indiscutiblemente tiene el establecimiento y puesta en circulación de monedas metálicas que lleven en sus aleaciones las máximas proporciones posibles de cobre y de plata.

3.ª La posible incorporación a las pastas de papel, que han de servir para la fabricación de billetes, de metales tales como cobre y plata.

4.ª Nosotros nos proponemos seguir estudiando este problema con objeto de poder obtener resultados que indiquen la conveniencia y técnica del apartado anterior.

5.ª En contra de la creencia lógica que haría suponer que por las condiciones disgenésicas no se desarrollarían gérmenes de una marcada acción patógena, a la vista de los resultados obtenidos queda demostrada la gran patogeneidad de algunas de las especies identificadas (ver parte descriptiva) y comprobada biológicamente en los animales de experimentación.

Como resumen de todas las anteriores conclusiones, deducimos el peligro desde el punto de vista social que tiene la falta de renovación periódica del papel moneda y la necesidad de su control.

SUMMARY

The authors have verified microbiological assays with a series of bank-notes and describe the number and the genus of microorganisms that they have found in it.

They study the oligodinamic action of metals—copper and silver—associated in the paper paste and they believe that this addition is advisable.

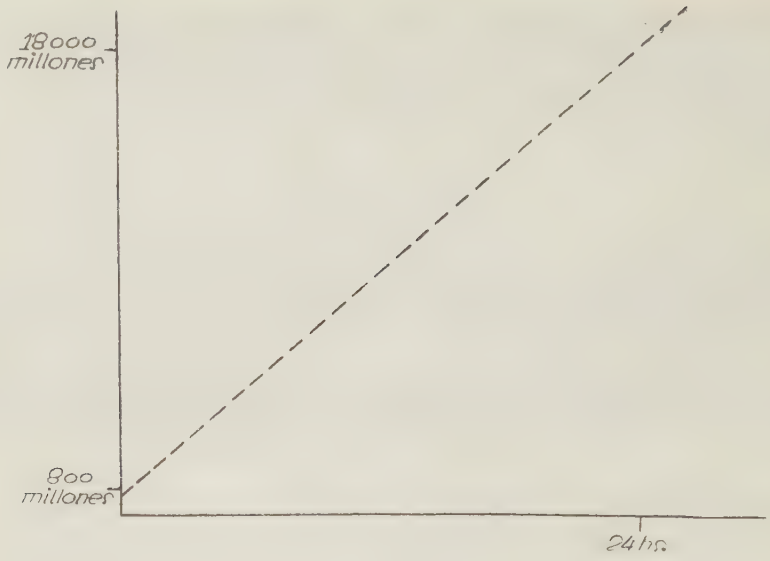


FIG. 1.
Aumento del número de gérmenes debidó a la maceración en estufa a 37º durante veinticuatro horas.

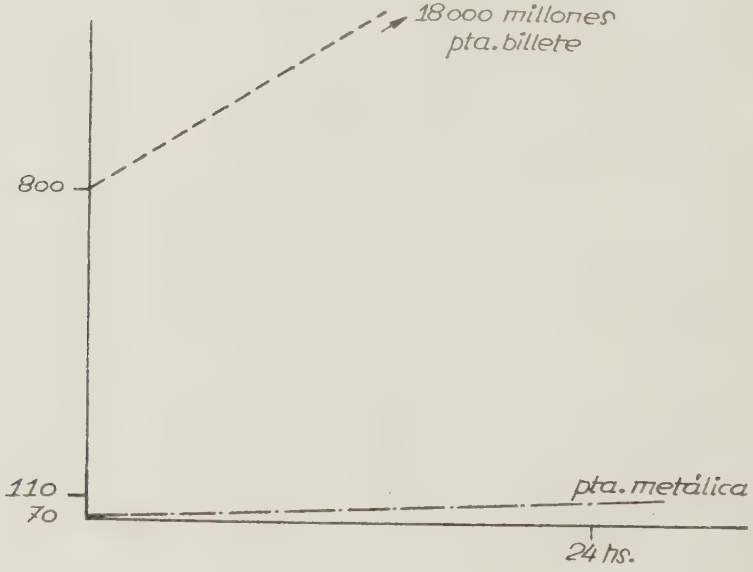


FIG. 2.
Gráfica comparativa del aumento del número de gérmenes debida a la maceración en estufa a 37º durante veinticuatro horas en peseta billete y peseta metálica.

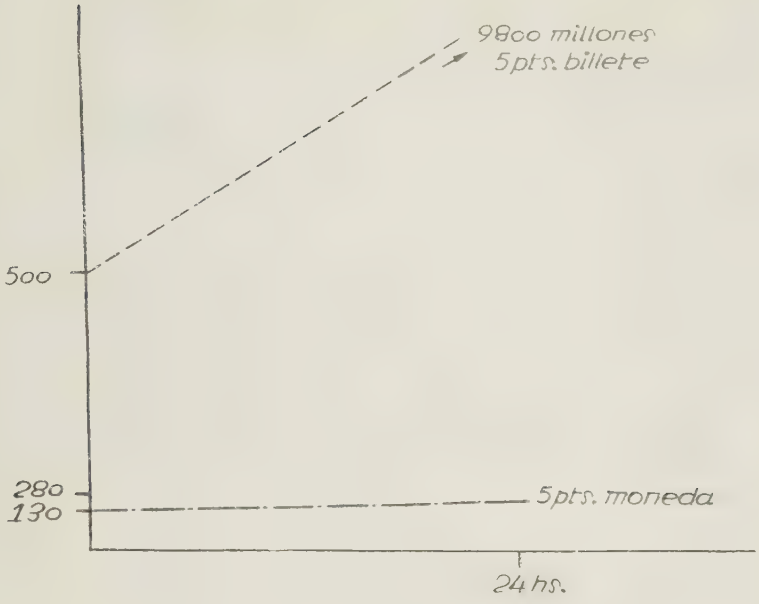


FIG. 3.
Gráfica comparativa del aumento del número de gérmenes debida a la maceración en estufa a 37° durante veinticuatro horas en billete de cinco pesetas y moneda metálica del mismo valor.

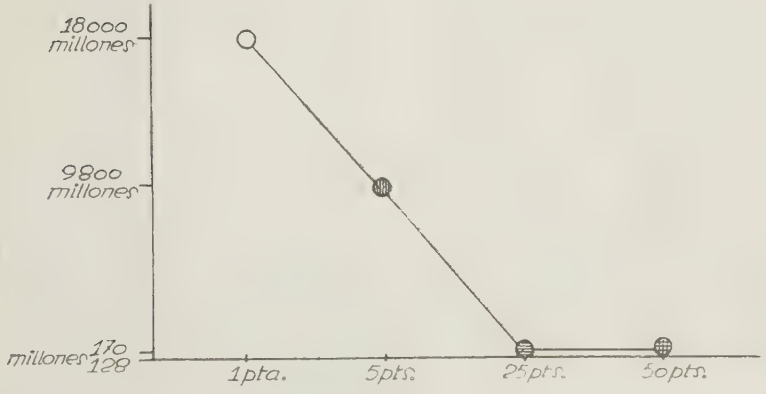


FIG. 4.
Gráfica comparativa de los datos que hemos obtenido en el recuento de gérmenes totales de los billetes de 1, 5, 25, 50 pesetas.

FIG. 5.

Gráficas comparativas del número de gérmenes que hemos hallado en cultivos de billetes de 1, 5, 25, 50 pesetas y referidos a un cm.².

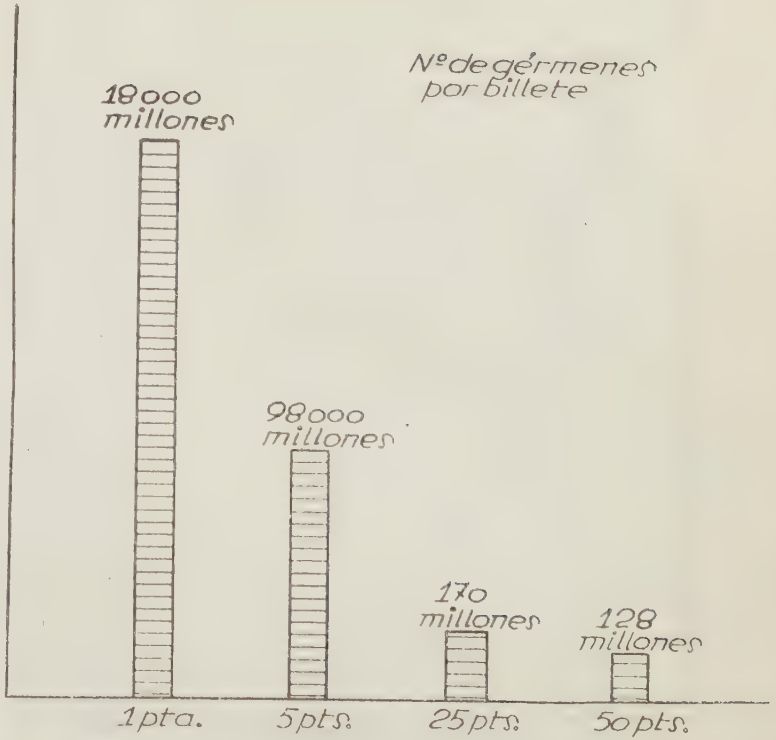


FIG. 6

Gráfica comparativa del número total de gérmenes que hemos hallado al efectuar el recuento en las siembras en placa de suspensiones procedentes de billetes de 1, 5, 25 y 50 pesetas

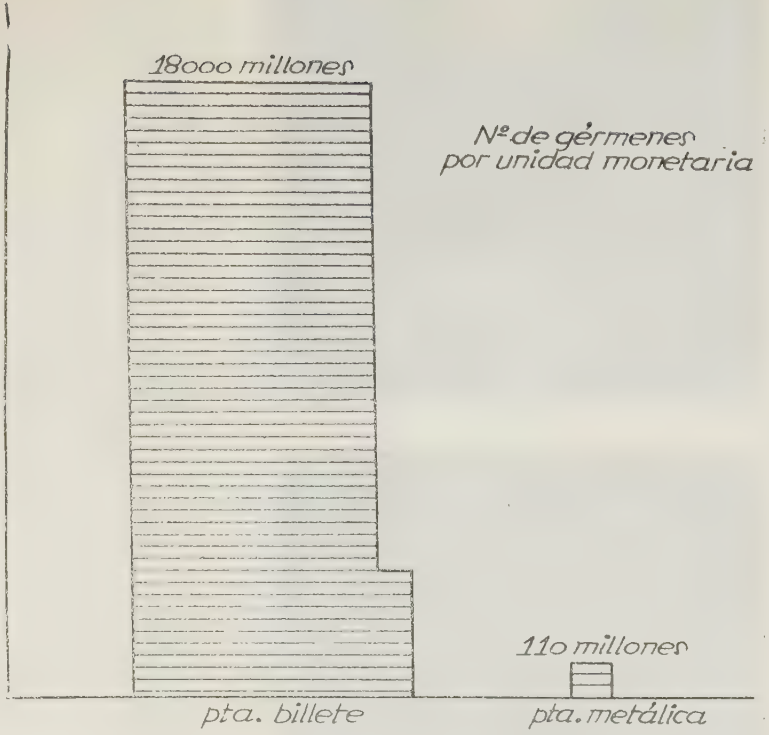


FIG. 7.
Diferencia en el número de gérmenes hallados, según se trate de peseta metálica o peseta billete.

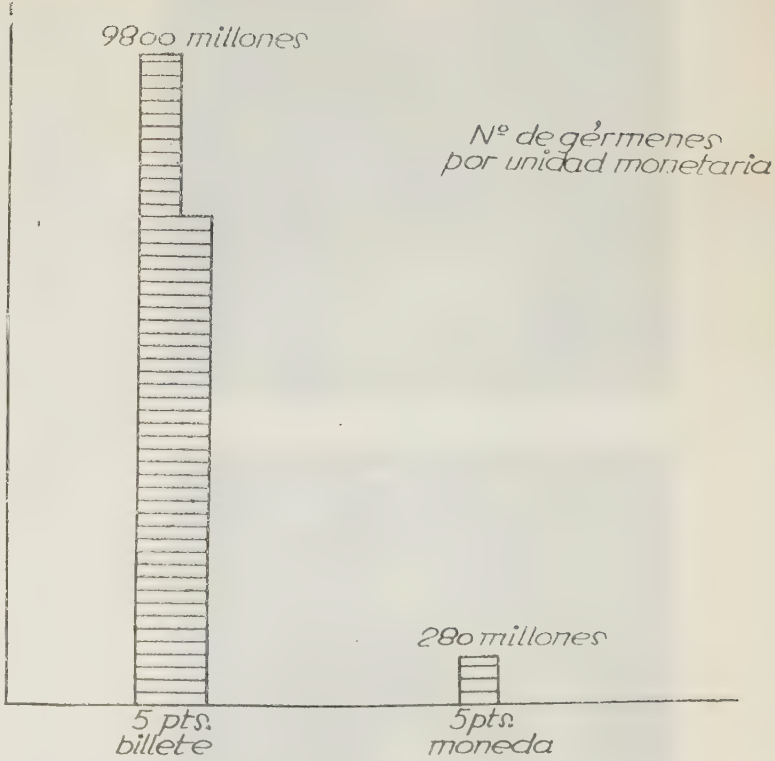
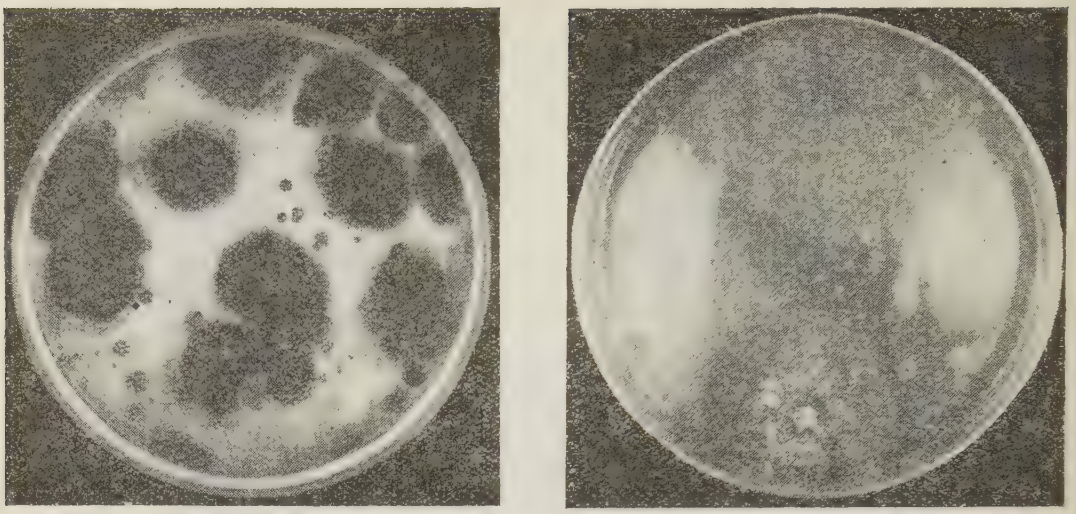


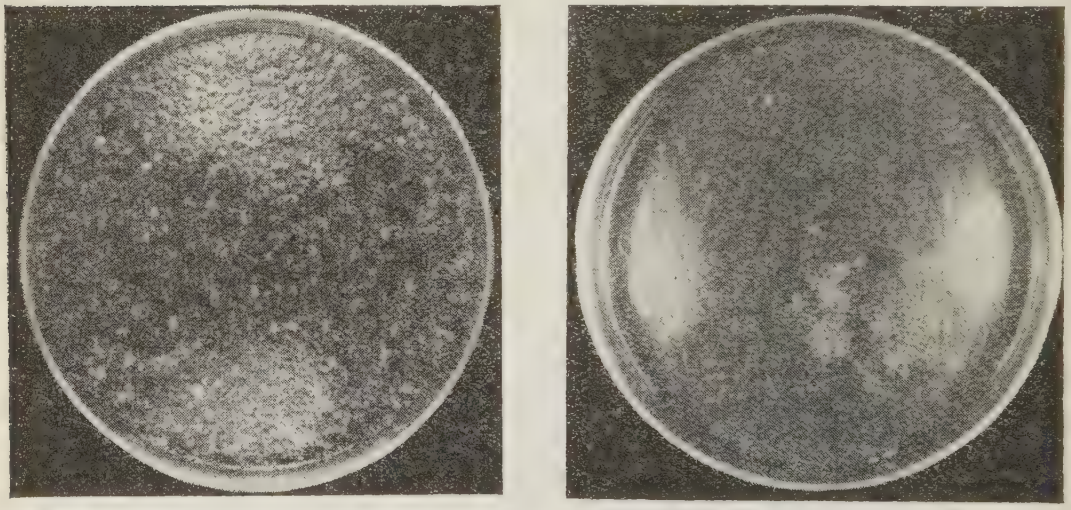
FIG. 8.
Diferencia en el número de gérmenes hallados, según se trate de cinco pesetas metálicas o cinco pesetas billete.



a *b*

FOTO 1

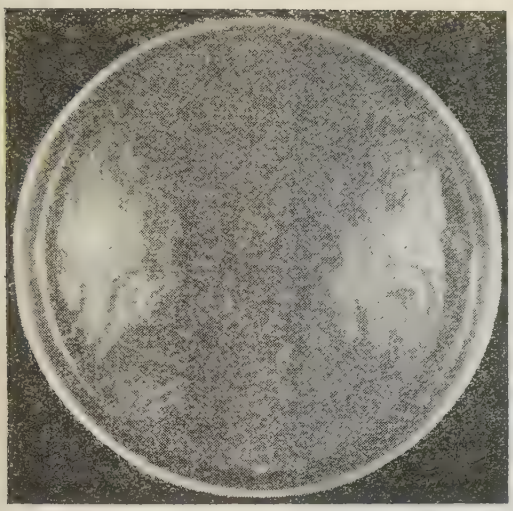
Cultivo de hongos en hagar placa *(a)* y en agar placa Sabouraud *(b)*.



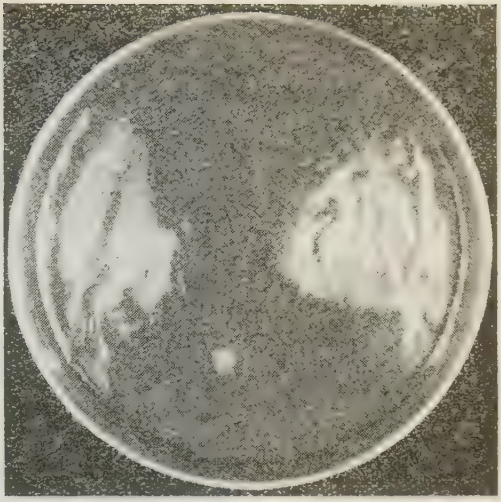
a *b*

FOTO 2.

Diferencia de concentración de cultivo, debido a la siembra de 1 c. c. procedente en *a* de la suspensión del billete de peseta—a dilución 1/1.000000—, y en *b* del lavado de una peseta metálica, sin dilución alguna. La técnica con que se ha operado ha sido la misma en ambos casos.



a



b

FOTO 3.

Diferencia de concentración de cultivo, debido a la siembra de 1 c. c. procedente en *a* de la suspensión del billete de cinco pesetas—a dilución 1/1.000000—, y en *b* del lavado de cinco pesetas metálicas, sin dilución alguna. La técnica con que se ha operado ha sido la misma en ambos casos.

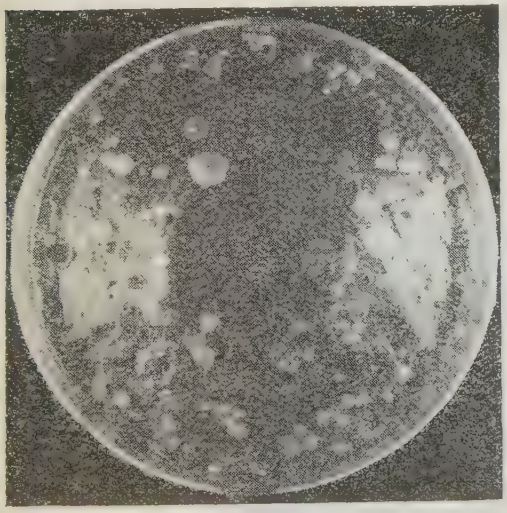


FOTO 4.

Cultivo obtenido sembrando en agar placa por homogeneización un c. c. de la suspensión de un billete de peseta a dilución 1/25.000000, y después de veinticuatro horas en estufa a 37°.

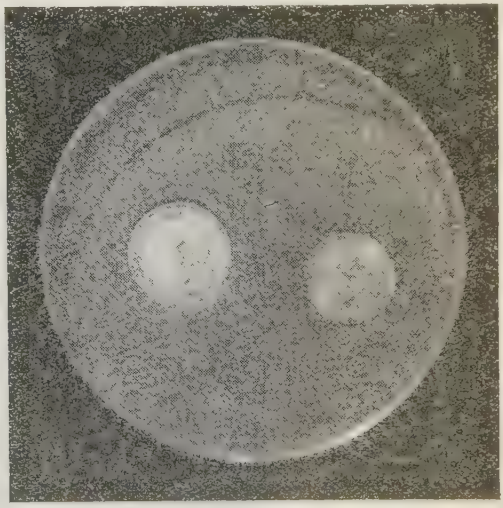


FOTO 5.

Fotografía comparativa de la acción oligodinámica de moneda de peseta de plata y de curso legal. Alrededor de la primera se ve el halo de inhibición.

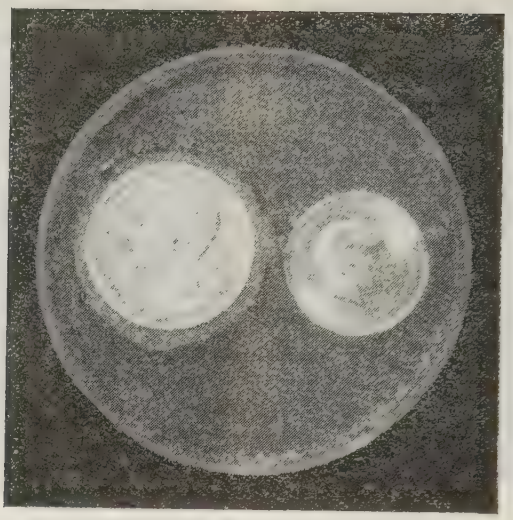


Foto 6.

Fotografía comparativa de la acción oligodinámica de moneda de cinco pesetas de plata y de curso legal. Alrededor de la primera se ve el halo de inhibición.

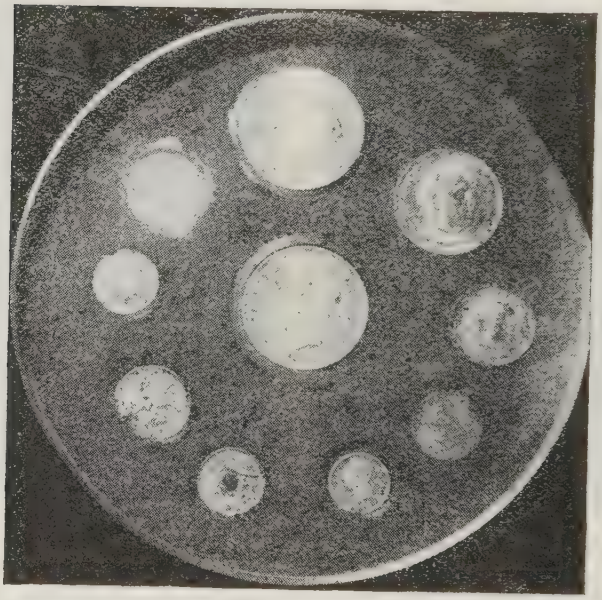


Foto 7.

Fotografía comparativa del juego de monedas 0.05, 0.10, 0.50, 1, 2.50 y 5 pesetas de curso legal y de plata. Alrededor de estas últimas se observa el halo de inhibición.

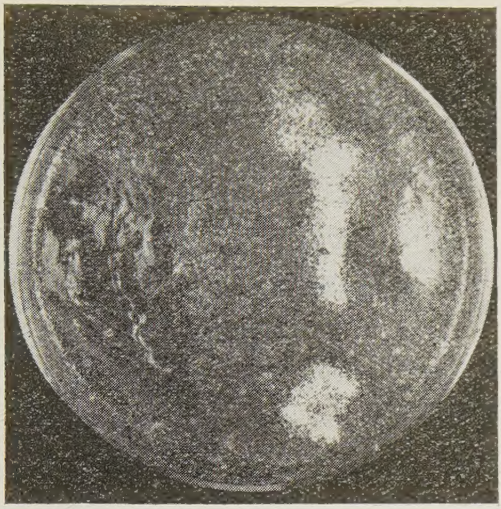


FOTO 8.

Acción oligodinámica e inhibidora del polvo de Ag y tiras de Cu, en un cultivo obtenido a partir de la siembra de un volumen de la suspensión de un billete de peseta en agar común.

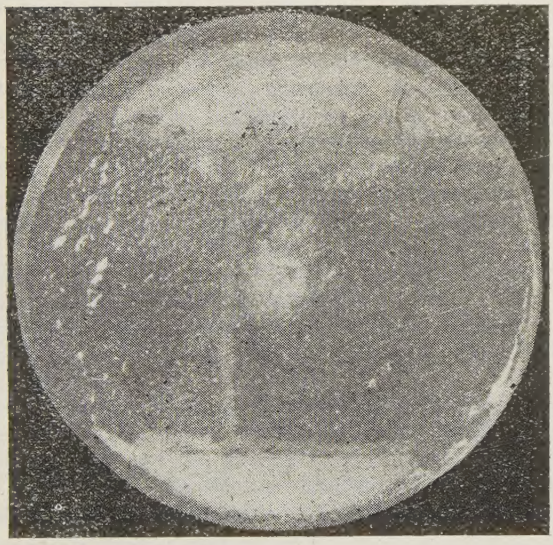
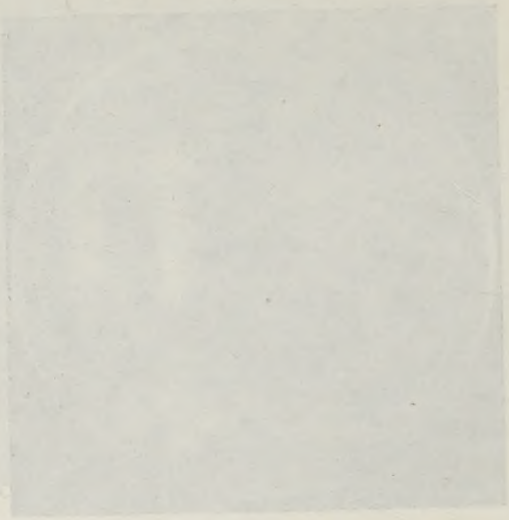
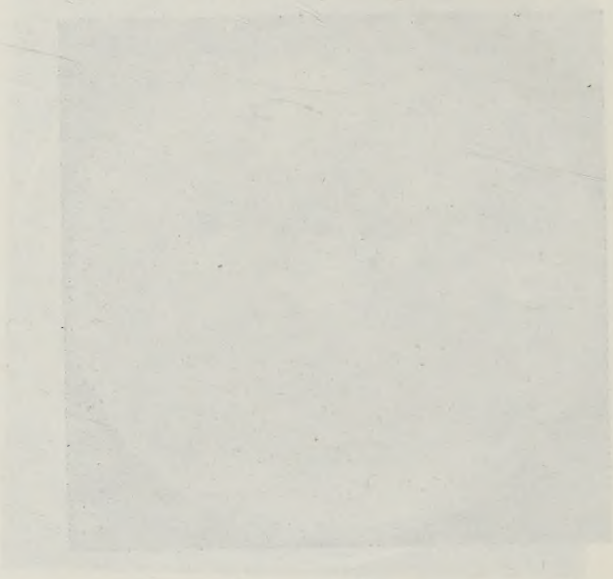


FOTO 9.

Zona inhibida por la acción oligodinámica de la tira metálica incluída en un billete de cien pesetas.





OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Gonadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE D ESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó JOAQUÍN COSTA, 32
MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números: 110 pesetas.

A. LOBO. - Libertad, 33 Teléf. 21 31 61 - MADRID

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA